

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Dezember 2000 (07.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/73464 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/37**,
C07K 14/025, C12N 5/22, A61K 38/16, 39/12, G01N
33/68, C12N 15/62

D-82152 Planegg/Martinsried (DE). **DEUTSCHES
KREBSFORSCHUNGSZENTRUM** [DE/DE]; Im
Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05005

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
31. Mai 2000 (31.05.2000)

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **JOCHMUS, Ingrid**
[DE/DE]; Freilandstrasse 15a, D-82194 Gröbenzell (DE).
NIELAND, John [NL/DE]; Englestrasse 4, D-81477
München (DE). **OSEN, Wolfram** [DE/DE]; Grenzhöfer
Weg 28/5, D-69123 Heidelberg (DE). **FAATH, Stefan**
[DE/DE]; Freilandstrasse 15a, D-82194 Gröbenzell (DE).
SCHÄFER, Klaus [DE/DE]; Gotenweg 13, D-68623
Lampertheim (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 25 235.1 1. Juni 1999 (01.06.1999) DE

(74) **Anwalt: BÖSL, Raphael**; Bardehle, Pagenberg, Dost,
Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679
München (DE).

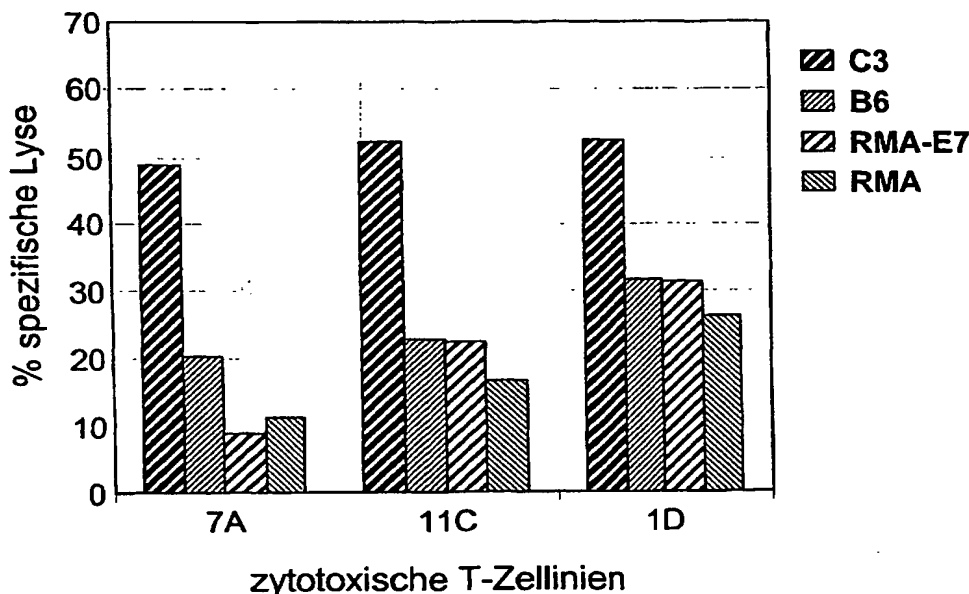
(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Aus-
nahme von US): MEDIGENE AKTIENGE-
SELLSCHAFT** [DE/DE]; Lochhamer Strasse 11,

(81) **Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, JP, US.**

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** CYTOTOXIC T-CELL EPITOPES OF THE PAPILLOMAVIRUS L1-PROTEIN AND USE THEREOF IN DIAGNOS-
TICS AND THERAPY

(54) **Bezeichnung:** ZYTOTOXISCHE T-ZELLEPTOPE DES PAPILLOMAVIRUS L1-PROTEINS UND IHRE VERWENDUNG
IN DIAGNOSTIK UND THERAPIE



(57) **Abstract:** The invention relates to a papillomavirus T-cell epitope with an amino acid sequence AQIFNKPYW, AGVDNRECI, and/or a functionally active variant thereof, and to the use thereof in diagnostics and therapy.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/73464 A1



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— *Mit internationalem Recherchenbericht.*

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Papillomavirus T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz AQIF-NKPYW, AGVDNRECI, und/oder eine funktionell aktive Variante davon, sowie ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie.

Zytotoxische T-Zellepitope des Papillomavirus L1-Proteins und ihre Ver-
5 **wendung in Diagnostik und Therapie**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Papillomavirus T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz AQIFNKPYW, AGVDNRECI, und/oder eine funktionell
10 aktive Variante davon, sowie ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie.

Die Papillomviren, auch Warzenviren genannt, sind doppelsträngige DNA-Viren mit einer Genomgröße von etwa 8000 Basenpaaren und einem Ikosaederförmigen Kapsid mit einem Durchmesser von ca. 55 nm. Bis heute sind mehr als
15 100 verschiedene humanpathogene Papillomavirustypen (HPV) bekannt, von denen einige, z.B. HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-39, HPV-45, HPV-52 oder HPV-58, bösartige Tumore und andere, z.B. HPV-6, HPV-11 oder HPV-42 gutartige Tumore verursachen können.

20 Das Genom der Papillomaviren läßt sich in drei Bereiche unterteilen: Der erste Bereich betrifft eine nicht-kodierende Region, die Regulationselemente für die Transkription und Replikation des Virus enthält. Die zweite Region, sogenannte E-(Early)Region enthält verschiedene Protein-kodierende Abschnitte E1-E7, von denen z.B. das E6- und das E7-Protein für die Transformation von Epithelzellen
25 verantwortlich sind und das E1-Protein die DNA-Kopienzahl kontrolliert. Bei der E6- und E7-Region handelt es sich um sogenannte Onkogene, die auch in bösartig entarteten Zellen exprimiert werden. Die dritte Region, auch L-(Late)Region genannt, enthält zwei Protein-kodierende Abschnitte L1 und L2, die für Strukturkomponenten des Viruskapsids kodieren. Das L1-Protein ist zu über 90% im vi-

- 2 -

ralen Kapsid vorhanden, wobei das Verhältnis von L1:L2 im allgemeinen 30:1 ist. Unter dem Begriff L1-Protein versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung das Hauptkapsid Protein der Papillomaviren (Baker T. et al. (1991) Biophys. J. 60, 1445).

5

In über 50% der Fälle wird HPV-16 mit Gebärmutterhalskrebs (Cervixcarcinom) in Verbindung gebracht. HPV-16 ist der Hauptrisikofaktor für die Ausbildung von cervicalen Neoplasien. Das Immunsystem spielt eine wichtige Rolle beim Fortschreiten der Krankheit. So sind vermutlich zelluläre Immunantworten und insbesondere Antigen-spezifische T-Lymphozyten wichtig für den Abwehrmechanismus. Es wurde weiterhin gefunden, daß in hochgradig malignen cervicalen intraepithelialen Neoplasien (CIN II/III) und cervicalen Tumoren das E7-Gen konstitutiv in allen Schichten des infizierten Epithels exprimiert wird. Daher wird vor allem das E7-Protein als potentiell Tumorantigen und als Zielmolekül für aktivierte T-Zellen betrachtet (siehe z.B. WO 93/20844). Die E7-induzierte zelluläre Immunantwort im Patienten ist aber anscheinend nicht stark genug, um den Krankheitsverlauf zu beeinflussen. Die Immunantwort kann eventuell durch geeignete Impfstoffe verstärkt werden.

20 Es konnte gezeigt werden, daß die Expression des L1-Gens bzw. die Coexpression des L1- und L2-Gens zur Bildung von Capsomeren, stabilen Capsomeren, Capsiden oder Virus-ähnliche Partikel (VLPs für virus-like particle) führen kann (siehe z.B. WO 93/02184, WO 94/20137 oder WO 94/05792). Unter Capsomeren versteht man eine oligomere Konfiguration, die aus fünf L1-Proteinen aufgebaut ist. Das Capsomer ist der Grundbaustein, aus denen virale Capside aufgebaut sind. 25 Unter stabilen Capsomeren versteht man Capsomere, die nicht dazu in der Lage sind sich zu Capsiden zusammenzusetzen. Unter Capsiden versteht man die Hülle des Papillomavirus, die beispielsweise aus 72 Capsomeren zusammengesetzt ist (Baker T. et al. (1991) Biophys. J. 60, 1445). Unter VLP versteht man ein Capsid, 30 das morphologisch und in seiner Antigenität einem intakten Virus gleicht. Die

VLPs konnten zur Auslösung einer humoralen Immunantwort, die durch Bildung von neutralisierenden Antikörpern charakterisiert ist, in verschiedenen tierischen Systemen verwendet werden. Die Bildung von virus-neutralisierenden Antikörpern gegen L1- und/oder L2-Protein ist jedoch von geringerer klinischer Bedeutung, wenn die Virusinfektion bereits stattgefunden hat, da für die Eliminierung virus-infizierter Zellen keine Antikörper, sondern eine virus-spezifische zytotoxische T-Zell-(CTL)-Antwort notwendig zu sein scheint. Und obwohl VLPs in der Lage sind eine zytotoxische T-Zell-Antwort auszulösen, scheint eine ausschließlich gegen die Kapsidproteine L1 und/oder L2 gerichtete Immunantwort nicht zur Bekämpfung eines durch Papillomaviren bedingten Tumors geeignet.

Es wurden daher sogenannte chimäre Papillomavirus-ähnliche Partikel (CVLPs für chimeric virus-like particle) entwickelt, die aus einem Fusionsprotein des Kapsidproteins L1 und des potentiellen Tumorantigen E7 bestehen (WO 96/11272 und Müller, M. et al. (1997) Virology, 234, 93). Die CVLPs lösten nur im geringen Maße eine gegen das E7-Protein gerichtete humorale Immunantwort aus (Müller, M. et al. (1997), supra). Einige der getesteten CVLPs induzieren jedoch tatsächlich die erwünschte E7-spezifische zytotoxische T-Zellantwort in Mäusen (siehe auch Peng S. et al. (1998) Virology 240,147-57). CVLPs sind dadurch sowohl für die Entwicklung eines Impfstoffes als auch für die Behandlung bereits bestehender Infektionen und daraus resultierender Tumore interessant, da die über MHC-Moleküle der Klasse I-präsentierten E7-Peptide von Tumorzellen Zielmoleküle von zytotoxischen T-Zellen darstellen würden.

Einem Impfstoff bestehend aus CVLPs liegt das Prinzip der Pseudoinfektion der Zellen durch die CVLPs zugrunde. Dies bedeutet, daß die CVLPs wie Viren in die Zelle gelangen, dort zu Peptiden prozessiert werden, die Peptide auf MHC-Klasse I und II-Moleküle geladen werden und letztendlich CD8- bzw. CD4-positiven T-Zellen präsentiert werden. CD8-Zellen können als Folge dieser Stimulation zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren und dann eine zelluläre Immunantwort be-

wirken, CD4-Zellen hingegen entwickeln sich zu T-Helferzellen und stimulieren B-Zellen zu einer humoralen oder CD8-positive T-Zellen zu einer zytotoxischen Immunantwort und können selbst die Lyse von infizierten Zellen induzieren.

- 5 Kleine Peptide können bereits auf der Zelloberfläche an MHC-Klasse I-Moleküle binden und dann ohne weitere Prozessierung CD8- oder CD4-positive Zellen zu einer zellulären Immunantwort stimulieren. Ein bestimmtes Peptid kann jedoch nur durch bestimmte MHC-Moleküle gebunden werden. Durch den großen Polymorphismus der MHC-Moleküle in natürlichen Populationen kann deshalb ein
- 10 bestimmtes Peptid lediglich durch einen kleinen Teil einer Population gebunden und präsentiert werden. Unter Präsentation im Sinne der vorliegenden Erfindung wird verstanden, wenn ein Peptid oder Proteinfragment an ein MHC-Molekül bindet, wobei diese Bindung beispielsweise im endoplasmatischen Retikulum, im extrazellulären Raum, den Endosomen, Proendosomen, Lysosomen oder Protysosomen, stattfinden kann, und wenn dann dieser MHC-Molekül-Peptid-Komplex
- 15 auf der extrazellulären Seite der Zellmembran gebunden ist, so daß er durch Immunzellen spezifisch erkannt werden kann.

- Da CVLPs sowohl eine zelluläre als auch humorale Immunantwort auslösen und
- 20 nicht MHC-restringiert sind, eignet sich diese Technologie generell zur Entwicklung von Impfstoffen, indem die Fähigkeit zur Partikelbildung durch einen L1-Anteil zur Verfügung gestellt wird und ein zusätzlicher Antigenanteil an diesen L1-Anteil fusioniert wird.

- 25 Bei der Entwicklung derartiger CVLPs ist es unbedingt notwendig, ein funktionelles Testsystem zur Verfügung zu haben, mit dem man direkt die Immunogenität von CVLPs untersuchen kann. Ein derartiges Testsystem sollte die Eigenschaft besitzen, daß CVLPs mit unterschiedlichen Antigenanteilen mit demselben Testsystem untersucht werden können. Da für immunologische Therapieverfahren von

Tumoren oder Viruserkrankungen die zelluläre Immunantwort von entscheidender Bedeutung ist, stellte sich die Aufgabe, die durch CVLPs hervorgerufene zelluläre Immunantwort meßbar zu machen.

- 5 Die Lösung dieser Aufgabe gelang durch die Identifikation von T-Zell-Epitopen, die in Verbindung mit MHC-Molekülen, in einer besonderen Ausführungsform mit (H2-D^b) MHC-Molekülen in vivo und in vitro beispielsweise eine zytotoxische T-Zellantwort auslösen. Diese Peptide haben vorzugsweise die Sequenz AQIFNKPYW oder AGVDNRECI. Diese Sequenzen sind Bestandteil des L1-Peptid des HPV16. Sie umfassen die Aminosäurebereiche 330 bis 338 (L1₃₃₀₋₃₃₈) bzw. 165 bis 173 (L1₁₆₅₋₁₇₃).
- 10

- Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz AQIFNKPYW, AGVDNRECI, und/oder eine funktionell aktive Variante davon.
- 15

- Unter einer funktionell aktiven Variante von AQIFNKPYW oder AGVDNRECI versteht man ein T-Zell-Epitop, das in einem T-Zell-Zytotoxizitäts-Testsystem (siehe beispielsweise Beispiele 2-5 der vorliegenden Erfindung) eine, an der Zytotoxizität von AQIFNKPYW oder AGVDNRECI gemessene Zytotoxizität besitzt, die mindestens der Summe aus dem Mittelwert der Negativkontrollen und der dreifachen Standardabweichung entspricht, vorzugsweise von mindestens ca. 30%, insbesondere mindestens ca. 50% und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 80%.
- 20

25

Eine bevorzugte Variante ist beispielsweise ein T-Zell-Epitop mit einer Sequenzhomologie zu AQIFNKPYW oder AGVDNRECI von mindestens ca. 65%, vorzugsweise mindestens ca. 75% und insbesondere mindestens ca. 85% auf Ami-

nosäureebene. Andere bevorzugte Varianten sind auch T-Zell-Epitope, die eine strukturelle Homologie zu AQIFNKPYW oder AGVDNRECI haben. Solche Epitope können aufgefunden werden, indem man gegen die T-Zell-Epitope AQIFNKPYW, AGVDNRECI spezifische T-Zellen generiert (DeBruijn M.L. et al. (1991) Eur. J. Immunol. 21, 2963-70; und DeBruijn M.L. (1992) Eur. J. Immunol. 22, 3013-20) und beispielsweise synthetisch hergestellte Peptide nach Wahl auf Erkennung durch die peptidspezifischen T-Zellen getestet werden (siehe Beispiele). Insbesondere werden unter T-Zellepitopen zytotoxische T-Zellepitope verstanden. Es sind jedoch auch nicht zytotoxische T-Zellen bekannt, die ebenfalls MHC I-Moleküle erkennen können, so daß auch nicht-zytotoxische T-Zellepitope als Variante von der vorliegenden Erfindung umfaßt sind.

Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein T-Zell-Epitop, das Teil einer Verbindung ist, wobei die Verbindung kein natürlich vorkommendes L1 Protein eines Papillomavirus und keine ausschließlich N-terminale oder ausschließlich C-terminale Deletionsmutante eines natürlich vorkommenden L1 Proteins eines Papillomavirus ist. In einer besonderen Ausführungsform kann ein T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz AQIFNKPYW, AGVDNRECI, und/oder eine funktionell aktive Variante in einem L1-Protein eines anderen Papillomavirus oder in einem chimären L1-Protein, beispielsweise einem HPV18L1E7-Fusionsprotein, enthalten sein. Eine solche erfindungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung von CVLPs besitzen.

Vorzugsweise kann das genannte T-Zell-Epitop als Teil einer Verbindung ein Polypeptid, das in bevorzugter Weise weitere Aminosäuresequenzen enthält, insbesondere ein Fusionsprotein sein. Insbesondere kann die Verbindung ein Polypeptid von mindestens ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35 Aminosäuren, insbesondere von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 9 Aminosäuren Länge sein.

Um die Verbindung zu detektieren oder in ihrer Aktivität der Bindung an T-Zellen zu modifizieren, kann sie eine chemische, radioaktive Isotopen-, nicht radioaktive Isotopen-, und/oder Fluoreszenzmarkierung des T-Zell-Epitops und/oder des genannten Fusionsproteins enthalten.

Beispiele von dem Fachmann bekannten chemischen Substanzen, die sich für eine erfindungsgemäße chemische Markierung eignen, sind: Biotin, FITC (Fluoresceinisothiocyanat) oder Streptavidin.

10

Eine mögliche Ausführungsform ist, daß ein Peptid derart modifiziert wird, daß es mindestens ein Lysin enthält. An dieses Lysin wird in der dem Fachmann bekannter Weise Biotin oder FITC (fluorescein isothiocyanat) gekoppelt. Ein derartig modifiziertes Peptid wird an ein entsprechendes MHC-Molekül oder an eine Zelle mit entsprechenden MHC-Molekülen gebunden. Daraufhin kann das Peptid über markiertes Avidin oder Streptavidin bzw. direkt über die Fluoreszenz des FITC nachgewiesen werden.

Beispiele von dem Fachmann bekannten Isotopen, die sich für eine erfindungsgemäße radioaktive Isotopenmarkierung eignen, sind: ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P oder ^{14}C .

20

Beispiele von dem Fachmann bekannten Isotopen, die sich für eine erfindungsgemäße nicht radioaktive Isotopenmarkierung eignen, sind: ^2H oder ^{13}C .

25

Beispiele von dem Fachmann bekannten fluoreszierenden Substanzen, die sich für eine erfindungsgemäße Fluoreszenzmarkierung eignen, sind: ^{152}Eu , Fluoresceini-

sothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin, Phycocyanin, Allophycocyanin, o-Phtaldehyd oder Fluorescamin.

Dem Fachmann sind weitere hier nicht aufgeführte Markierung bekannt, die auch
5 im Sinne dieser Erfindung zur Markierung eingesetzt werden können.

Beispiele von dem Fachmann bekannten erfindungsgemäßen chemischen Modifikationen sind die Übertragung von Acetyl-, Phosphat-, und/oder Monosacharidgruppen

10

Erfindungsgemäße Polypeptide mit einer Aminosäurelänge von ca. 50 können beispielsweise durch eine chemische Peptidsynthese hergestellt werden. Längere Polypeptide werden vorzugsweise gentechnisch erzeugt. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Nukleinsäurekonstrukt zur Expression
15 des genannten T-Zell-Epitops oder der Verbindungen, das folgende Komponenten enthält: (a) mindestens ein regulatorisches Element und (b) mindestens eine Nukleinsäure, die für eine Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Verbindung kodiert. Das genannte Nukleinsäurekonstrukt ist vorzugsweise aus DNA oder RNA. Geeignete regulatorische Elemente erlauben beispielsweise die konstitutive,
20 regulierbare, gewebsspezifische, zellzyklusspezifische oder metabolischspezifische Expression in eukaryotischen Zellen oder die konstitutive, metabolischspezifische oder regulierbare Expression in prokaryotischen Zellen. Regulierbare Elemente gemäß der vorliegenden Erfindung sind Promotoren, Aktivatorsequenzen, Enhancer, Silencer, und/oder Repressorsequenzen.

25

Beispiele für geeignete regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryoten ermöglichen sind Promotoren die von der RNA Polymerase III erkannt werden oder virale Promotoren, wie CMV-Enhancer, CMV-Promotor, SV40

Promotor und virale Promotor-und Aktivatorsequenzen, abgeleitet aus beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, EBV HTLV oder HIV.

Beispiele für regulierbare Elemente, die regulierbare Expression in Eukaryoten ermöglichen sind der Tetrazyklinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen M. et al (1994) Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20).

Beispiele für regulierbare Elemente, die gewebsspezifische Expression in Eukaryoten ermöglichen sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in bestimmten Zelltypen exprimiert werden.

Beispiele für regulierbare Elemente, die zellzyklusspezifische Expression in Eukaryoten ermöglichen sind die Promotoren der folgenden Gene: cdc25C, Cyclin A, Cyclin E, cdc2, E2F, B-myb oder DHFR (Zwicker J. und Müller R. (1997) Trends Genet. 13, 3-6).

Beispiele für regulierbare Elemente, die metabolisch spezifische Expression in Eukaryoten ermöglichen sind Promotoren, die durch Hypoxie, durch Glucosemangel, durch Phosphatkonzentration oder durch Hitzeschock reguliert werden.

Um die Einführung der genannten Nukleinsäure und damit die Expression des Polypeptids in einer eu- oder prokaryotischen Zelle durch Transfektion, Transformation oder Infektion zu ermöglichen, kann die Nukleinsäure als Plasmid, als Teil eines viralen, oder nicht viralen Vektors vorliegen. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb ein Vektor, insbesondere ein Expressionsvektor, der eine Nukleinsäure codierend für ein erfindungsgemäßes Polypeptid enthält. Als virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Baculoviren, Vakzi-

niaviren, Adenoviren, adenoassoziierte Viren und Herpesviren. Als nicht virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Virosomen, Liposomen, kationische Lipide, oder Poly-Lysin konjugierte DNA.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die mindestens ein T-Zell-Epitop enthält, vorzugsweise präsentiert. In einer besonderen Ausführungsform wird die Zelle durch einen der genannten Vektoren transfiziert, transformiert oder infiziert. Diese Zelle exprimiert unter dem Fachmann bekannten Bedingungen, die zur Aktivierung der jeweils verwendeten regulierbaren Elemente führen, das erfindungsgemäße Polypeptid. Das Polypeptid kann dann aus
10 dieser Zelle isoliert und z.B. unter Verwendung einer der oben genannten Markierungen aufgereinigt werden. Zur gentechnischen Herstellung und anschließenden Aufreinigung der exprimierten, erfindungsgemäßen Verbindungen eignen sich prokaryotische und eukaryotische Zellen, insbesondere Bakterienzellen wie beispielsweise E. coli, Hefezellen wie beispielsweise S. cerevisiae, Insekten Zellen wie beispielsweise Spodoptera frugiperda Zellen (Sf-9) oder Trichoplusia ni Zellen oder Säugerzellen wie beispielsweise COS-Zellen oder HeLa-Zellen.
15

- Eine bevorzugte Ausführungsform ist es, die Zelle, die das erfindungsgemäße Polypeptide exprimiert, selbst zu verwenden, wobei in einer besonders bevorzugten Ausführungsform die Zelle Teile das erfindungsgemäßen Polypeptids über MHC-1 Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert. Für die Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle sind Antigen-präsentierende Zellen wie beispielsweise B-Zellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen, embryonalen Zellen oder Fibroblasten, in einer bevorzugten Ausführungsform B16F10-, B6-, C3-, EL4-, RMA- oder RMA-S-Zellen geeignet. Die erfindungsgemäßen Zellen, die ein Polypeptid
25 enthaltend ein T-Zell-Epitop, präsentieren, können als Zielzellen zur Restimulation von Immunzellen, insbesondere T-Zellen und/oder zur Messung der Aktivierung von T-Zellen eingesetzt werden. Unter Zielzelle im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle zu verstehen, die über MHC-Moleküle ein T-Zell-Epitope
30

präsentiert und damit spezifisch eine T-Zell-Aktivierung hervorruft, insbesondere eine zytotoxische T-Zell-Reaktion gegen die Zelle.

5 Ferner kann die ein T-Zell-Epitop enthaltene Verbindung, Teil eines Komplexes sein, der dadurch charakterisiert ist, daß die Verbindung kovalent oder über hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenbindung oder Wasserstoffbrückenbindungen mit mindestens einer weiteren Spezies wie Peptide, Proteine, Peptoide, lineare oder verzweigte Oligo- oder Polysacharide und Nukleinsäuren verbunden ist.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop oder eine Verbindung und mindestens eine weitere Verbindung. Eine bevorzugte Ausführungsform ist, daß das Polypeptid in Verbindung mit MHC Klasse I-Molekülen, vorzugsweise als H2-D^b-Tetramer vorliegt. Besonders bevorzugt sind humane oder murine MHC-Klasse I Moleküle, insbesondere ein von
15 C57B1/6 Mäusen abgeleitetes MHC-Klasse I Molekül. Durch die Technik von Altman J.D. et al. (1996, Science 274, 94-6) lassen sich beispielsweise H2-D^b-Tetramere mit den entsprechenden gebundenen Peptiden herstellen, die in der Lage sind, an die T-Zellrezeptoren von peptidspezifischen zytotoxischen T-Zellen zu binden.

20

Eine weitere Ausführungsform ist die Immobilisierung der erfindungsgemäßen Verbindung oder des genannten Komplexes an Trägermaterialien. Als Trägermaterialien eignen sich beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers,
25 insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente wie Cellulose oder Gerüstproteine.

Zur Aufreinigung des erfindungsgemäßen Komplexes kann eine Komponente des Komplexes zusätzlich noch ein Protein-Tag enthalten. Erfindungsgemäße Protein-Tags erlauben beispielsweise die hochaffine Absorption an eine Matrix, stringentes Waschen mit geeigneten Puffern ohne den Komplex im nennenswerten Maße zu eluieren und anschließende gezielte Elution des absorbierten Komplexes. Beispiele von dem Fachmann bekannten Protein-Tags, sind ein N- oder C-terminales (HIS)₆-Tag, ein Myc-Tag, ein FLAG-Tag, ein Hämagglutinin-Tag, Glutathion-Transferase (GST)-Tag, Intein with an Affinity Chitin-binding Tag oder Maltose binding protein (MBP)-Tag. Die erfindungsgemäßen Protein-Tags können sich N-, C-terminal, und/oder intern befinden.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen durch mindestens eine Verbindung, enthaltend ein T-Zell-Epitop. Ein derartiges Verfahren besteht vorzugsweise aus drei Schritten:

- a) In einem ersten Schritt werden Zellen mit mindestens einer Verbindungen enthaltend ein T-Zell-Epitop stimuliert. Diese Verbindung kann mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens ein Capsomer, mindestens ein stabiles Capsomer, mindestens ein VLP, mindestens ein CVLP, und/oder mindestens ein Virus bedeuten. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Immunzellen durch die Inkubation mit CVLPs stimuliert. Diese Stimulation kann beispielsweise in Form einer Impfung erfolgen, oder durch Inkubation von Immunzellen mit CVLPs in vitro. Derartig stimulierte Immunzellen werden beispielsweise nach einer Impfung aus der Milz, aus Lymphknoten oder aus dem Blut gewonnen, und/oder werden kultiviert.

- b) In einem zweiten Schritt werden Zellen mit mindestens einem erfindungsgemäßen T-Zell-Epitop, mindestens einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert und/oder mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex inkubiert.
- 5
- c) In einem dritten Schritt erfolgt die Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen. Hierfür geeignete Verfahren sind beispielsweise der Nachweis der Produktion oder Sekretion von Cytokinen durch die T-Zellen, der Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen, der Lyse von Zielzellen oder der Proliferation von Zellen. Hierfür geeignete Methoden sind beispielsweise ein Cytokinassay (Chapter 6.2 bis 6.24 in Current Protocols in Immunology (1999), edited by Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. and Strober W., John Wiley & Sons), ELISPOT (Chapter 6.19 in Current Protocols in Immunology, supra), ein ⁵¹Cr-Freisetzungstest (Chapter 3.11 in Current Protocols in Immunology, supra) oder der Nachweis der Proliferation (Chapter 3.12 in Current Protocols in Immunology, supra). Je nach verwendeter Methode kann dabei auch zwischen den Immunzellen wie zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen, B-Zellen, NK-Zellen und anderen Zellen unterschieden werden. Die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen, Komplexen, und/oder Zellen, die erfindungsgemäße Markierungen enthalten, erlaubt die Detektion von T-Zellen, die das T-Zell-Epitop erkennen über den Nachweis der Bindung markierter Verbindungen, Komplexe, und/oder Zellen an die T-Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bindung erfindungsgemäßer MHC-Polypeptid-Komplexe an die Oberfläche der T-Zellen nachgewiesen. Dies kann derart durchgeführt werden, daß die MHC-Komplexe selbst markiert, beispielsweise fluoreszenzmarkiert sind, oder daß man in einem weiteren Schritt einen MHC-spezifischen, markierten, beispielsweise fluoreszenzmarkierten Antikörper verwendet, um wiederum die MHC-Komplexe nachzuweisen. Die Fluoreszenzmarkierung der T-Zellen läßt sich dann beispielsweise in einem 'Fluorescens Activated
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30

Cell Sorter' (FACS) messen und auswerten. Eine andere Möglichkeit zum Nachweis der Bindung von den Komplexen an die T-Zellen ist erneut die Messung der Aktivierung von T-Zellen (Cytokinassay, Elispot, ⁵¹Cr-Freisetzungstest, Proliferation, siehe oben). Allerdings benötigt man hierfür die gleichzeitige Stimulation von Korezeptoren (z. B. CD28), beispielsweise durch Korezeptor-spezifische Antikörper (Anti-CD28) und/oder andere unspezifische Aktivatoren (IL-2).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren, das einen zusätzlichen Schritt a') enthält, der nach Schritt a) eingeführt wird.

a') In diesem zusätzlichen dem Schritt a) nachfolgenden Schritt a') werden werden die isolierten oder kultivierten Zellen mit mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP und/oder mindestens einem Virus, mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert, für mindestens ca. 12 Tage, insbesondere ca. 5 Tage cokultiviert, bevor sich Schritt b) anschließt.

Unter Cokultivierung ist das Wachstum der Zellen:

- (i) in Gegenwart von mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,
- (ii) in Gegenwart mindestens eines erfindungsgemäßen Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop,

(iii) in Gegenwart mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert,

im selben Wachstumsmedium und selben Gewebekulturbedälter zu verstehen.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer T-Zell-Epitop präsentierenden Zielzelle. Hierbei ist es möglich, die Zielzelle mit Kombinationen von unterschiedlichen T-Zell-Epitopen zu beladen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle mit mindestens einer
10 Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop und/oder mindestens einem Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop inkubiert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle in Wachstumsmedium, das erfindungsgemäße Polypeptide enthält, oder mit MHC Klasse I-Komplexen mit gebundenen erfindungsgemäßen Polypeptiden inkubiert. Die MHC Klasse I-Komplexe können beispielsweise als H2-D^b-Tetramere vorliegen. Ein Tetramer bindet dabei in der Regel vier Peptide. Diese können sowohl identisch sein oder aber unterschiedliche Spezies von Peptiden repräsentieren. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Zielzelle mit einer Nukleinsäure und/oder einem Vektor transfiziert, transformiert und/oder infiziert. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform
20 wird die Zielzelle mit einem Vakziniavirusvektor infiziert. Das erfindungsgemäße Verfahren wird mit Antigen-präsentierenden Zellen beispielsweise mit B-Zellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen, embryonalen Zellen oder Fibroblasten, in einer bevorzugten Ausführungsform mit B16F10-, B6-, C3-, EL4-, RMA- oder RMA-S-Zellen durchgeführt.

25

Die verwendeten CVLPs enthalten ein Papillomavirus L1-Protein oder Varianten davon, insbesondere HPV16 L1-Protein und, jedoch nicht notwendigerweise, ein zu L1 heterologes Protein oder Varianten davon. Die zwei Proteine können direkt oder indirekt gebunden vorliegen. Direkt gebunden meint im Sinne der Erfindung,

daß eine kovalente Bindung zwischen den beiden Proteinen vorliegt, beispielsweise eine Peptidbindung oder eine Disulfidbindung. Indirekt gebunden bedeutet, daß die Proteine über nicht-kovalente Bindungen gebunden sind, beispielsweise hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenbindungen oder Wasserstoffbrücken. In einer
5 weiteren Ausführungsform enthalten die CVLPs zusätzlich zu L1-Protein oder Varianten davon ein Papillomavirus L2-Protein.

Eine bevorzugte Ausführung des L1-Proteins der vorliegenden Erfindung sind beispielsweise L1-Proteine mit einer oder mehreren Deletionen, insbesondere einer C-terminalen Deletion. Eine C-terminale Deletion hat den Vorteil, daß die
10 Effizienz der Bildung virus-ähnlicher Partikel gesteigert werden kann, da das am C-Terminus lokalisierte nukleäre Lokalisationssignal deletiert wird. Die C-terminale Deletion beträgt daher vorzugsweise bis zu ca. 35 Aminosäuren, insbesondere ca. 25 bis ca. 35 Aminosäuren, vor allem ca. 32 bis ca. 34 Aminosäuren.
15 Beispielsweise ist eine 32 Aminosäuren lange C-terminale Deletion des HPV16 L1-Proteins ausreichend, um die Bildung von virus-ähnlichen Partikeln um das mindestens ca. zehnfache steigern zu können. Des weiteren kann das L1-Protein eine oder mehrere Mutationen tragen oder der L1-Anteil aus L1-Proteinen verschiedener Papillomaviren zusammengesetzt sein. Gemeinsames Kennzeichen der
20 erfindungsgemäßen L1-Proteine ist, daß sie die Bildung von VLPs bzw. CVLPs zulassen und daß sie mindestens ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das L1-Protein oder Varianten davon und das zu L1 heterologe Protein ein Fusionsprotein. Beinhaltet sind auch heterologe Proteine, die aus mehreren verschiedenen Proteinen oder Teilen davon
25 zusammengesetzt sind. Dies können beispielsweise auch Epitope, insbesondere zytotoxische T-Zellepitope von Proteinen sein. Epitope im Sinne der Erfindung können dabei auch Teil eines synthetischen Polypeptids mit einer Länge von ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35 Aminosäuren, insbesondere

re von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von mindestens ca. 9 Aminosäuren sein.

Bevorzugt sind zu L1 heterologe Proteine, die von einem viralen Protein abgeleitet sind, beispielsweise abgeleitet von HIV, HBV oder HCV, vorzugsweise von
5 Papillomaviren, insbesondere von humanen Papillomaviren.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist dies ein E-Protein eines Papillomavirus, vorzugsweise ein E6- und/oder E7-Protein. Insbesondere ist bevorzugt, wenn
10 das E-Protein ein deletiertes E-Protein ist, vorzugsweise ein C-terminale deletiertes, insbesondere ein C-terminal deletiertes E7-Protein, da diese Konstrukte in Verbindung mit deletiertem L1-Protein bevorzugt virus-ähnliche Partikel ausbilden können. Insbesondere bevorzugt sind Deletionen bis zu 55 Aminosäuren, vorzugsweise ca. 5 bis ca. 55 Aminosäuren, insbesondere ca. 38 bis ca. 55 Aminosäuren.
15 ren.

In einer weiteren Ausführung kann das zu L1 heterologe Protein von Antigenen nicht viraler Erreger abstammen. Ebenso können sie von Autoimmunantigenen wie z.B. Thyroglobulin, Myelin basic protein oder Zona Pellucida Glycoprotein 3
20 (ZP₃), die mit bestimmten Autoimmunkrankheiten wie z.B. Thyroiditis, Multiple Sklerose, Oophoritis oder rheumatoider Arthritis assoziiert sind, abgeleitet sein. In einer bevorzugten Ausführung stammt das zu L1 heterologe Protein von Tumorantigenen ab, vorzugsweise Melanomaantigenen wie MART, Ovarialcarcinomantigenen wie Her2 neu (c-erbB2), BCRA-1 oder CA125, Colonicarcinomantigenen wie CA125 oder Mammacarcinomantigenen wie Her2 neu (c-erbB2),
25 BCRA-1, BCRA-2.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist ein Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen, die durch Präparation aus Proben gewonnen werden. Dieses Verfahren erlaubt es zu bestimmen, ob in einer Probe, beispielsweise einer Blutprobe eines Patienten oder in der Milz einer Maus, Papillomavirus

5 L1-Protein-spezifische zytotoxische T-Zellen vorhanden sind. Ein derartiges Nachweisverfahren enthält die folgenden Schritte:

- a“) In einem ersten Schritt werden Zellen gewonnen, beispielsweise durch Blutabnahme von einem Patienten oder durch die Präparation zum Beispiel der Milz oder von Lymphknoten einer Maus. Anschließend werden die
- 10 Zellen in Wachstumsmedium aufgenommen und kultiviert.
- b) In einem zweiten Schritt werden Zellen mit mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert oder mit mindestens einem Komplex, der als eine Komponente eine Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitope umfaßt, inkubiert.
- 15 c) In einem dritten Schritt erfolgt die Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen. Hierfür geeignete Verfahren sind beispielsweise der Nachweis der Produktion oder Sekretion von Cytokinen durch die T-Zellen, der Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen, der Lyse von Zielzellen oder der Proliferation von Zellen. Hierfür geeignete Methoden sind beispielsweise ein Cytokinassay (Chapter 6.2 bis 6.24 in Current Protocols in Immunology (1999), edited by Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. and Strober W., John Wiley & Sons), ELISPOT (Chapter 6.19 in Current Protocols in Immunology, supra), ein ⁵¹Cr-Freisetzungstest (Chapter 3.11 in Current Protocols in Immunology, supra) oder der Nach-
- 20 weis der Proliferation (Chapter 3.12 in Current Protocols in Immunology, supra). Je nach verwendeter Methode kann dabei auch zwischen den Immunzellen wie zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen, B-Zellen, NK-Zellen und anderen Zellen unterschieden werden. Die Verwendung von erfindungsgemäßen Verbindungen, Komplexen, und/oder Zellen die erfindungsgemäße Markierungen enthalten erlaubt die Detektion von T-Zellen, die das
- 25
- 30

T-Zell-Epitop erkennen über den Nachweis der Bindung markierter Verbindungen, Komplexe, und/oder Zellen an die T-Zellen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bindung erfindungsgemäßer MHC-Polypeptid-Komplexe an die Oberfläche der T-Zellen nachgewiesen. Dies kann derart durchgeführt werden, daß die MHC-Komplexe selbst markiert, beispielsweise fluoreszenzmarkiert sind, oder daß man in einem weiteren Schritt einen MHC-spezifischen, markierten, beispielsweise fluoreszenzmarkierten Antikörper verwendet, um wiederum die MHC-Komplexe nachzuweisen. Die Fluoreszenzmarkierung der T-Zellen läßt sich dann beispielsweise in einem 'Fluorescens Activated Cell Sorter' (FACS) messen und auswerten. Eine andere Möglichkeit zum Nachweis der Bindung von den Komplexen an die T-Zellen ist erneut die Messung der Aktivierung von T-Zellen (Cytokinassay, Elispot, ⁵¹Cr-Freisetzungstest, Proliferation, siehe oben). Allerdings benötigt man hierfür die gleichzeitige Stimulation von Korezeptoren (z. B. CD28), beispielsweise durch Korezeptor-spezifische Antikörper (Anti-CD28) und/oder andere unspezifische Aktivatoren (IL-2).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren, das einen zusätzlichen Schritt a') enthält, der nach Schritt a'') eingeführt wird.

a') In diesem zusätzlichen dem Schritt a'') nachfolgenden Schritt a') werden die isolierten oder kultivierten Zellen mit mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP und/oder mindestens einem Virus, mit mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert, für mindestens ca. 12 Tage, insbesondere ca. 5 Tage cokultiviert, bevor sich Schritt b) anschließt.

Unter Cokultivierung ist das Wachstum der Zellen:

- 5 (i) in Gegenwart von mindestens einer Zielzelle beladen mit einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,
- (ii) in Gegenwart mindestens eines erfindungsgemäßen Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop,
- 10 (iii) in Gegenwart mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop präsentiert,
- im selben Wachstumsmedium und selben Gewebekulturbedälter zu verstehen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Testsystem (Kit) zum in vitro
15 Nachweis der Aktivierung von T-Zellen enthaltend:

- a) mindestens ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop, mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung, mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor, mindestens eine erfindungsgemäße Zelle, und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex, und
- 20 b) Effektorzellen des Immunsystems, vorzugsweise T-Zellen, insbesondere zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Testsystem (Kit) zum in vitro
Nachweis der Aktivierung von T-Zellen enthaltend:

- 25 a) mindestens ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop, mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung, mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor, mindestens eine erfindungsgemäße Zelle, und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex, und

- b) Effektorzellen des Immunsystems, vorzugsweise T-Zellen, insbesondere zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen.

Das Testsystem wird in einer besonderen Ausführungsform zur Bestimmung der, beispielsweise in einer Blutprobe eines Patienten oder in der Milz einer Maus vorhandenen L1-Protein-spezifischen zytotoxischen T-Zellen verwendet. In diesem Fall sind die in b) beschriebenen Zellen im Testsystem enthaltene Kontrollzellen, deren Aktivierung durch die erste Kitkomponente, die unter a) genannten Substanzen, als Standard dient. Die in dieser Reaktion beobachteten Aktivierung wird mit die T-Zell-Aktivierung von aus Patienten oder Mäusen isolierten Zellen durch die Kitkomponente a) verglichen.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform wird das Testsystem beispielsweise zur Bestimmung der L1-Protein-spezifischen Antigenität einer Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, eines Komplexes enthaltend ein T-Zell-Epitop, eines Capsomers, eines stabilen Capsomers, eines VLPs, eines CVLPs, und/oder eines Virus verwendet. In diesem Fall sind die in a) beschriebenen Substanzen Kontrollsubstanzen deren aktivierende Wirkung auf die zweite Kitkomponente, die unter b) genannten Zellen, als Standard dient. Die in dieser Reaktion beobachteten Aktivierung wird mit der aktivierenden Wirkung einer Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, einem Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop, einem Capsomer, einem stabilen Capsomer, einem VLP, ein CVLP, und/oder einem Virus auf die Kitkomponente b) verglichen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von mindestens einem T-Zell-Epitop, mindestens einer erfindungsgemäßen Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einem erfindungsgemäßen Vektor enthaltend eine Nukleinsäure kodierend für eine ein T-Zell-Epitop enthaltende Verbindung, mindestens einer erfindungsgemäßen Zelle enthaltend ein T-Zell-Epitop zur, und/oder

mindestens einem erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop zur Auslösung oder zum Nachweis einer Immunantwort.

Zur Stimulation von Immunzellen in vitro wie in vivo eignen sich insbesondere
5 Zellen, die mindestens eines der erfindungsgemäßen Moleküle über ihre MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren. Zur Antigen-Präsentation geeignete Zellen sind z. B. B-Zellen, dendritische Zellen, Macrophagen, embryonale Zellen oder Fibroblasten, die durch eine gemeinsame Kultivierung mit Immunzellen eine Stimulation von spezifischen T-Zellen erreichen können.

10

In einer besonderen Ausführungsform kann eine erfindungsgemäße Verbindung beispielsweise ein HPV18 L1E7-Fusionsprotein, das zusätzlich ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthält, zur Detektion einer Immunantwort eingesetzt werden. Eine solche erfindungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung
15 von CVLPs besitzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel oder Diagnostikum enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop, mindestens einen Vektor enthaltend eine Nukleinsäure kodierend für eine
20 ein T-Zell-Epitop enthaltende Verbindung, mindestens eine erfindungsgemäße Zelle enthaltend ein T-Zell-Epitop, und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitop und gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

25 Beispiele von dem Fachmann bekannten Trägern sind Glas, Polystyren, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Nylon, Amylase, natürliche oder modifizierte Zellulose, Polyacrylamide, Agarose, Aluminiumhydroxid oder Magnitid.

Ein erfindungsgemäßes Arzneimittel oder Diagnostikum kann in Lösung vorliegen, an eine feste Matrix gebunden sein und/oder mit einem Adjuvans versetzt sein.

5 Das Arzneimittel oder Diagnostikum kann auf verschiedene Weisen verabreicht werden. Beispiele von dem Fachmann bekannten Verabreichungsformen sind parenterale, lokale und/oder systemische Applikation durch z. B. orale, intranasale, intravenöse, intramuskuläre, und/oder topische Applikation. Die bevorzugte Applikationsform wird beispielsweise durch den natürlichen Infektionsweg der jeweiligen Papillomavirusinfektion beeinflusst. Die verabreichte Menge richtet sich
10 nach Alter, Gewicht, allgemeinem Gesundheitszustand des Patienten und dem Typ der Papillomavirusinfektion. Das Arzneimittel oder Diagnostikum kann in Form von Kapseln, Lösung, Suspension, Elixier (für orale Applikation) oder sterile Lösungen bzw. Suspensionen (für parenterale oder intranasale Applikation)
15 verabreicht werden. Als inerter und immunologisch akzeptabler Träger kann beispielsweise Salzlösung oder phosphatgepufferte Salzlösung verwendet werden. Das Arzneimittel wird in therapeutisch effektiven Mengen verabreicht. Das bedeutet Mengen, die ausreichend sind, um eine schützende immunologische Antwort hervorzurufen.

20

In einer besonderen Ausführungsform kann eine erfindungsgemäße Verbindung beispielsweise ein HPV18 L1E7-Fusionsprotein, das zusätzlich ein erfindungsgemäßes T-Zell-Epitop enthält, als Arzneimittel oder Diagnostikum eingesetzt werden. Eine solche erfindungsgemäße Verbindung kann die Fähigkeit zur Bildung
25 von CVLPs besitzen.

Die Figuren und die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

Fig. 1 zeigt die graphische Auswertung der spezifischen Lyse von verschiedenen murinen B6-Zellen, die entweder mit MVA-L1_{ΔC} oder mit MVA-F6 infiziert worden waren, durch Milzzellen von Mäusen, die entweder mit VLPs bzw. mit Puffer geimpft worden waren. Aufgetragen ist das Verhältnis der Effektorzellen zu den Zielzellen gegen die Prozent der spezifisch lysierten Zellen.

Fig. 2 zeigt die graphische Auswertung der spezifischen Lyse von verschiedenen RMA-S-Zellen, die entweder L1₃₃₀₋₃₃₈, L1₁₆₅₋₁₇₃ oder AM präsentieren, durch die Milzzellen von Mäusen, die mit VLPs bzw. mit Puffer geimpft worden waren. Aufgetragen ist das Verhältnis der Effektorzellen zu den Zielzellen gegen die Prozent der spezifisch lysierten Zellen.

Fig. 3 zeigt die graphische Auswertung der spezifischen Lyse von vier verschiedenen Zelllinien durch T-Zellen, die zuvor mit MVA-L1_{ΔC}-infizierten EL4-Zellen (links) oder mit L1₁₆₅₋₁₇₃-beladenen RMA-S-Zellen restimuliert worden waren. Aufgetragen ist das Verhältnis der Effektorzellen zu den Zielzellen gegen die Prozent der spezifisch lysierten Zellen.

Fig. 4 zeigt die graphische Auswertung der spezifischen Lyse von vier verschiedenen Zielzelllinien durch drei verschiedene zytotoxische T-Zelllinien.

Fig. 5 zeigt die graphische Auswertung der spezifischen Lyse von unterschiedlichen Zielzellen, entweder verschiedenen Zelllinien oder RMA-S-Zellen, die mit den L1-Peptiden L1-1 bis L1-15 beladen worden waren, durch drei verschiedene zytotoxische T-Zelllinien.

Beispiele

1. Beschreibung der Ausgangsmaterialien

- 5 - Die Herstellung von HPV16 L1_{ΔC}E7₁₋₅₅ CVLPs erfolgte gemäß der deutschen Patentanmeldung DE 198 12 941.6 (siehe auch Müller M. et al. (1997) Virology 234, 93-111).
- L1 VLPs (siehe Müller M. et al. (1997) Virology 234, 93-111)
- C57B1/6-Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Wilmington, MA,
10 USA) bezogen.
- MVA-L1_{ΔC} bedeutet rekombinantes murines Vakziniavirus, das in infizierten Zellen HPV16 L1_{ΔC} exprimiert.
- MVA-F6 bedeutet Vakziniavirus (Kontrollvirus).
- B6-Zellen bedeutet embryonale Stammzellen aus einer C57B1/6-Maus.
- 15 - C3-Zellen bedeutet HPV16 und ras-transformierte B6-Embryozellen (siehe Feltkamp M.C. et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23, 2242-9).
- RMA-Zellen stammen aus einem Thymom einer C57BL/6-Maus (siehe Ljunggren H.G. & Kärre K. (1985) J. Exp. Med. 162, 1745-59).
- RMA-S-Zellen stammen aus einem Thymom einer C57BL/6-Maus (siehe
20 Ljunggren H.G. & Kärre K. (1985) J. Exp. Med. 162, 1745-59). Sie weisen einen Defekt im Antigenprozessierungs-assoziiertem Transport auf, der zur Unterbindung der Beladung von MHC-1 Molekülen im endoplasmatischen Retikulum führt. Die dennoch auf der Zelloberfläche vorhandenen unbeladenen MHC-1 Moleküle können beispielsweise durch Inkubation der Zellen in
25 Peptid-haltigen Medien beladen werden, so daß sich diese Zellen sehr gut zur Präsentation eines Antigens eignen (siehe Powis S.J. et al. (1991) Nature 354, 528-31).

- 26 -

- EL4-Zellen stammt aus einem Thymom einer C57B1/6-Maus (siehe Shevach E.M. et al. (1972) J. Immunol. 108, 1146-51), z. B. ATCC TIB-49.
- Zellen wurden jeweils bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-Medium (Gibco BRL, Eggenstein) mit 10% fötalem Kälberserum, Kanamycin, Ampicillin kultiviert.
- 5 - AM-Peptid bedeutet Aminosäuren 366 bis 374 des Influenza Nukleoproteins, Sequenz: ASNENMETM (siehe Townsend A.R. et al. (1986) Cell 44, 959-68).
- L1-Peptide bedeutet von HPV16 abgeleitetes Peptid des L1 Hauptkapsidproteins.

10

2. Induktion von L1-spezifischen CTL nach Immunisierung mit L1 VLPs

a) Immunisierung von Mäusen mit VLPs:

15 Zwei C57B1/6-Mäuse wurden mit 10 µg L1 VLPs (Maus 1) oder zur Kontrolle mit Puffer (Maus 2) immunisiert. Nach 6 Wochen wurden die Milzzellen isoliert.

b) Herstellung von Antigen-präsentierenden Zellen (Zielzellen):

20 B6-Zellen wurden für 2,5 Tage mit Interferon γ inkubiert, anschließend über Nacht mit MVA-L1_{ΔC}-Viren (MOI = 5) für die Herstellung Antigen-präsentierender Zellen oder mit MVA-F6 für die Herstellung von Kontrollzellen infiziert und für 16h kultiviert. In einem nächsten Schritt wurden die infizierten B6-Zellen bestrahlt und dadurch am weiteren Wachstum gehindert.

25

c) Restimulation der isolierten Milzzellen:

Die Milzzellen aus Maus 1 und 2 wurden jeweils gemeinsam mit den L1_{ΔC}-exprimierenden B6-Zellen, die als Stimulatorzellen für die T-Zellen der Milzzellen fungierten, für 5 Tage kultiviert.

5 d) Test der Zytotoxizität der isolierten Milzzellen:

Die stimulierten Milzzellen (Effektorzellen) der Maus 1 (VLP-geimpft) und 2 (Puffer-geimpft) wurden entweder mit MVA-L1_{ΔC}-infizierten oder mit MVA-F6-infizierten B6-Zellen (Zielzellen), die jeweils zuvor in Anwesenheit von ⁵¹Cr für 1h bei 37°C inkubiert worden waren, in fünf verschiedenen
10 Verhältnissen von Effektorzellen zu Zielzellen für 4h inkubiert. Die spezifische Lyse der Zielzellen wurde durch die Freisetzung des radioaktiven ⁵¹Cr in einem β-Counter gemessen (siehe Fig. 1).

Ergebnis: Die Milzzellen der L1-immunisierten Maus lysierten die MVA-L1_{ΔC}-
15 infizierten Zielzellen, die MVA-F6-infizierten Zielzellen hingegen nicht. Die Milzzellen besaßen somit eine spezifische Zytotoxizität gegen das L1-Protein. Die Kontroll-Milzzellen, die aus der mit Puffer geimpften Maus stammten, zeigten keine lytische Aktivität gegenüber den Zielzellen.

20 3. Peptid-spezifische Lyse von Zielzellen durch L1-spezifische T-Zellen (VLP-geimpfte Mäuse)

a) Herstellung Antigen-präsentierender Zellen:

RMA-S-Zellen wurden während einer einstündigen Inkubation mit ⁵¹Cr bei
25 37°C zusätzlich mit einem Peptid (Konzentration 50 μM) inkubiert. Als Peptid wurde entweder

- L1₃₃₀₋₃₃₈,

- L1₁₆₅₋₁₇₃ oder
 - das AM-Peptid (als Kontrolle)
- verwendet.

5 b) Test der Zytotoxizität der isolierten Milzzellen:

Die gemäß Beispiel 1c hergestellten stimulierten Milzzellen (Effektorzellen) der Maus 1 (VLP-geimpft) und 2 (Puffer-geimpft) wurden mit den Peptid-inkubierten RMA-S-Zellen (Zielzellen) in Anwesenheit von 0,5 µg/ml des jeweiligen Peptids für 4h in sechs verschiedenen Verhältnissen von Effektorzellen zu Zielzellen inkubiert. Die spezifische Lyse der Zielzellen wurde
10 durch die Freisetzung des radioaktiven ⁵¹Cr in einem β-Counter gemessen (siehe Fig. 2).

Ergebnis: Die mit L1₁₆₅₋₁₇₃ präinkubierten Zielzellen konnten durch die Milzzellen
15 der L1-immunisierten Maus 1 effektiv lysiert werden, während die Präinkubation von RMA-S Zellen mit L1₃₃₀₋₃₃₈ oder dem Kontroll-Peptid AM keine deutliche Lyse der RMA-S Zellen durch die stimulierten Milzzellen bewirkte. Die Milzzellen der Puffer-geimpften Maus 2 zeigten für keine der Peptid präinkubierten RMA-S Zellen spezifische lytische Aktivität. Das Peptid L1₁₆₅₋₁₇₃ stellt somit in
20 diesen Zellen ein spezifisches zytotoxisches T-Zellepitop dar.

4. Peptid-spezifische Lyse von Zielzellen durch L1-spezifischen T-Zellen (CVLP-geimpfte Maus)

a) Immunisierung von Mäusen mit CVLPs:

5 Eine Maus wurde mit 10 µg L1_{ΔC}E7₁₋₅₅ CVLPs immunisiert. Die Milzzellen wurden nach 2 Wochen isoliert.

b) Herstellung von Antigen-präsentierenden Zellen:

10 EL4-Zellen wurden wie in 1b) beschrieben mit MVA-L1_{ΔC}-infiziert. RMA-S-Zellen wurden wie in 3a) beschrieben mit L1₁₆₅₋₁₇₃-beladenen.

c) Restimulation der isolierten Milzzellen:

15 Die isolierten Milzzellen von 4a) wurden jeweils für 12 Tage mit den beiden unter 4b) beschriebenen Zelltypen EL4/MVA-L1_{ΔC} bzw. RMA-S/L1₁₆₅₋₁₇₃-inkubiert.

d) Test der Zytotoxizität der isolierten Milzzellen

20 Anschließend wurde ein Zytotoxizitätstest analog zu Beispiel 2d) oder 3b) durchgeführt. Dabei wurde jeweils die Lyse der EL4/MVA-L1_{ΔC}-Zellen bzw. der RMA-S/L1₁₆₅₋₁₇₃-Zellen in fünf verschiedenen Verhältnissen von Effektorzellen zu Zielzellen bestimmt. Als Kontrolle dienten entweder EL4-Zellen, die mit einem leeren MVA-F6-Vektor infiziert worden waren, bzw. RMA-S-Zellen, die nicht mit L1₁₆₅₋₁₇₃ vorinkubiert worden waren (siehe Fig. 3)

Ergebnis: Fig. 3 zeigt die Auswertung des ^{51}Cr -Freisetzungstest analog zu Beispiel 1 oder 2. Die Milzzellen waren sowohl nach Kultivierung mit EL4/MVA-L1 Δ C-Zellen wie auch mit RMA-S/L1₁₆₅₋₁₇₃-Zellen in der Lage, die das L1-Peptid-präsentierenden Zielzellen effektiv zu lysieren (EL4/MVA-L1 Δ C-Zellen oder
5 RMA-S/L1₁₆₅₋₁₇₃-Zellen), während die Kontroll-Zellen nicht lysiert wurden. Dadurch daß die Erkennung von L1-exprimierenden Zellen vergleichbar ist mit den Peptid-präsentierenden Zellen kann man folgern, daß das Peptid L1₁₆₅₋₁₇₃ im wesentlichen für die Induktion der T-Zellantwort verantwortlich ist.

10 Dieses Ergebnis macht erneut deutlich, daß in CVLP-geimpften Mäusen eine CD8-T-Zellantwort gegen das HPV16 Peptid L1₁₆₅₋₁₇₃ induziert wird. Dabei ist es unwesentlich, ob die Impfung der Mäuse mit VLPs (siehe Beispiel 3) oder CVLPs (dieses Beispiel) durchgeführt wurde.

15 5. L1-spezifische zytotoxische T-Zellen

Eine Maus wurde zweimal mit 10^7 C3-Zellen geimpft (diese sind durch HPV16 und ras transformiert). Anschließend wurden die Milzzellen isoliert und in Gegenwart von bestrahlten C3-Zellen als Stimulatorzellen kultiviert und durch Zu-
20 gabe von C3-Zellen restimuliert. Durch Vereinzelung der Milzzellen wurden "Milzzellklone" kultiviert. Diese Klone wurden dann in Zytotoxizitätstests getestet, wie effizient sie C3-Zellen lysieren. In dem selben Test lysierten diese Klone weit weniger effizient B6, RMA- oder RMA-E7-Zellen (C3-Zellen exprimieren durch die HPV16-Transformation auch E7). Fig. 4 zeigt drei dieser zytotoxischen
25 Klone (= T-Zelllinien), die C3-Zellen deutlich effizienter lysieren als B6-, RMA-E7- oder RMA-Zellen.

Diese drei T-Zelllinien wurden dann in einem Zytotoxizitätstest gemäß einem der vorangegangenen Beispiele auf ihre Fähigkeit zur Lyse von C3-Zellen, von B6-Zellen, von RMA-S-Zellen sowie von RMA-S-Zellen, die zuvor mit verschiedenen L1-Peptiden (L1-1 bis L1-15; jeweilige Konzentration 50 µM) beladen worden waren, getestet. Fig. 5 zeigt, daß die T-Zelllinien 7A und 11C sehr effizient L1-14-beladene RMA-S-Zellen lysieren können. Somit sind genannte T-Zelllinien spezifisch für das L1-14-Peptid, bei dem es sich um das L1-Peptid 330-338 (L1₃₃₀₋₃₃₈) handelt. Die anderen getesteten Peptide wurden von diesen T-Zelllinien nicht erkannt. Die Sequenzen der getesteten Peptide sind wie folgt: L1-1: 5 GAMDFTTL, L1-2: GDSLFFYL, L1-3: MQVTFIYI, L1-4: VYHIFFQM, L1-5: VHTGFGAM, L1-6: KYPDYIKM, L1-7: VTFIYILV, L1-8: LEDTYRFV, L1-9: 10 GNQLFVTV, L1-10: KKYTFVTV, L1-11: ENDVNYHI, L1-12: AGVDNRECI, L1-13: TVGENVPDDL, L1-14: AQIFNKPYW, L1-15: YKNTNFKEYL

Patentansprüche

1. T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz AQIFNKPYW, AGVDNRECI, und/oder eine funktionell aktive Variante davon.
5
2. T-Zell-Epitop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Variante eine Sequenzhomologie zu AQIFNKPYW oder AGVDNRECI von mindestens ca. 65%, vorzugsweise mindestens ca. 75% und insbesondere mindestens ca. 85% auf Aminosäureebene besitzt.
10
3. T-Zell-Epitop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte Variante eine strukturelle Homologie zu AQIFNKPYW oder AGVDNRECI hat.
- 15 4. T-Zell-Epitop nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß das T-Zell-Epitop ein zytotoxisches T-Zell-Epitop ist.
5. Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Verbindung kein natürlich vorkommendes L1 Protein eines Papillomavirus und keine ausschließlich N-terminale oder ausschließlich
20 C-terminale Deletionsmutante eines natürlich vorkommenden L1 Proteins eines Papillomavirus ist.
6. Verbindung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Polypeptid, insbesondere ein Fusionsprotein ist.
25

7. Verbindung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Polypeptid von mindestens ca. 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens ca. 35 Aminosäuren, insbesondere von mindestens ca. 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von mindestens
5 ca. 10 Aminosäuren Länge ist.
8. Verbindung nach einem der Ansprüche 5-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung eine chemische, radioaktive, nicht radioaktive Isotopen und/oder Fluoreszenzmarkierung des T-Zell-Epitops und/oder des ge-
10 nannten Fusionsproteins, und/oder eine chemische Modifikation des T-Zell-Epitops und/oder Fusionsproteins enthält.
9. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein T-Zell-Epitop oder eine Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche
15 5-8 kodiert.
10. Vektor, insbesondere ein Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 enthält.
- 20 11. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8 enthält, vorzugsweise präsentiert.
12. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 und/oder einem Vektor gemäß Anspruch
25 10 transfiziert, transformiert, und/oder infiziert ist.

13. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle mit mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und/oder mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8, inkubiert wurde.
- 5
14. Zelle nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine B-Zelle, ein Makrophage, eine Dendritische Zelle, eine embryonale Zelle, ein Fibroblast, eine B16F10-, eine B6-, eine C3-, eine EL4-, eine RMA- oder eine RMA-S-Zelle ist.
- 10
15. Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitope gemäß einem der Ansprüche 1-4 oder eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und mindestens eine weitere Verbindung.
- 15
16. Komplex nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex mindestens ein MHC-Klasse I-Molekül, vorzugsweise als H2-D^b-Tetramer enthält.
- 20
17. Komplex nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte MHC-Klasse I Molekül ein humanes oder murines MHC-Klasse I Molekül, insbesondere ein von C57B1/6 Mäusen abgeleitetes MHC-Klasse I Molekül ist.
- 25
18. Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen durch mindestens eine Verbindung, enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, das folgende Schritte enthält:
- a) Stimulation von Zellen mit mindestens einer genannten Verbindung;

- b) Zugabe von mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 präsentiert oder eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 15-17, und
- c) Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen.

5

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es nach Schritt a) folgenden zusätzlichen Schritt a') enthält:

a') Cokultivierung der Zellen für ca. 12 Tage, insbesondere mindestens ca. 5 Tage mit:

- 10 (i) mindestens einer Zielzelle beladen mit einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,
- 15 (ii) mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17,
- (iii) und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 präsentiert,

bevor sich Schritt b) anschließt.

- 20 20. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach einem der Ansprüche 11, 13, 14, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzelle mit mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und/oder mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8, inkubiert wird.

25

21. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach einem der Ansprüche 11, 12, 14, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzellen mit einer

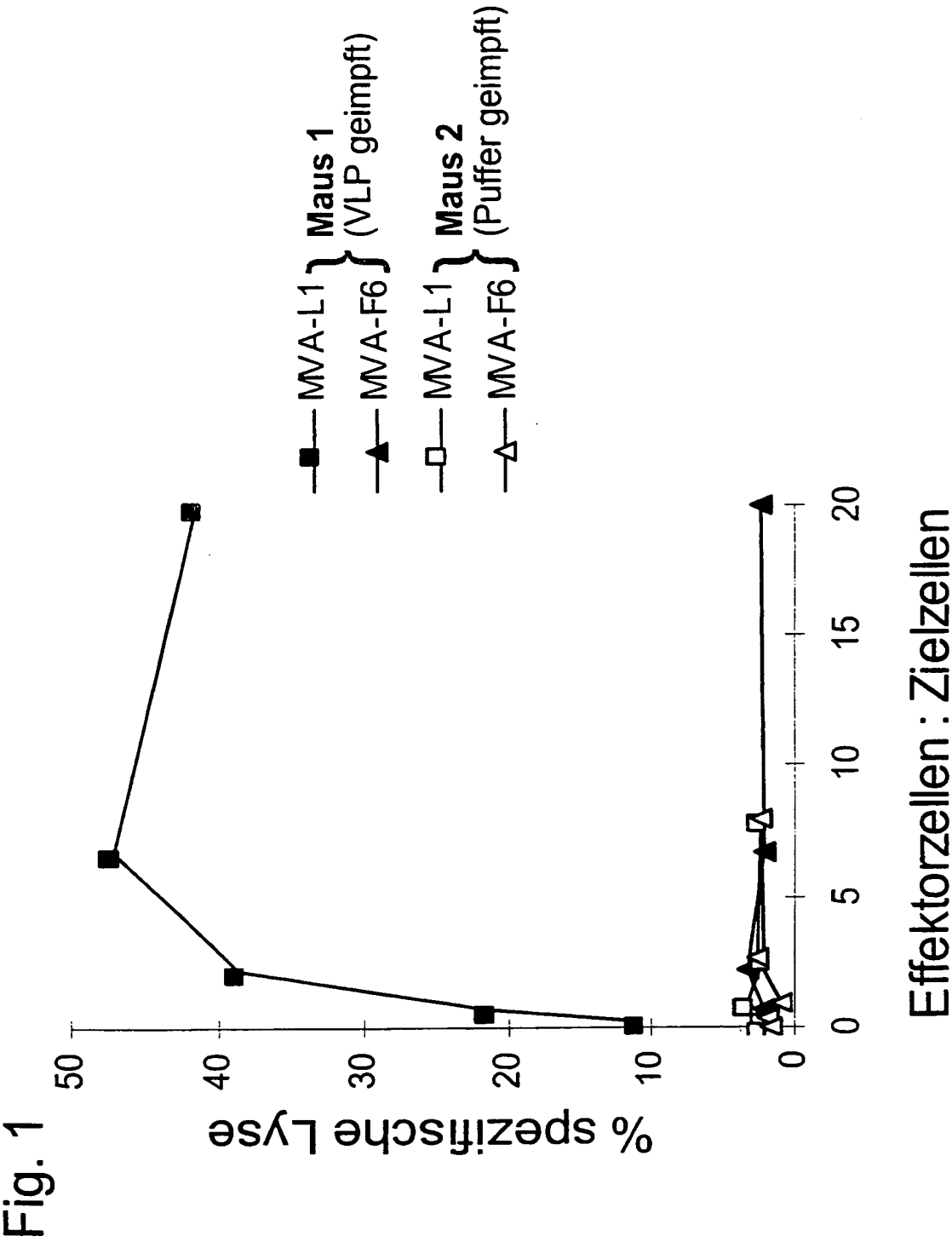
Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 und/oder einem Vektor gemäß Anspruch 10 transfiziert, transformiert und/oder infiziert wird.

22. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzelle eine B-Zelle, ein Makrophage, eine Dendritische Zelle, eine embryonale Zelle, ein Fibroblast, eine B16F10-, eine B6-, eine C3-, eine EL4-, eine RMA- oder eine RMA-S-Zelle ist.
23. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß anstelle von Schritt a) folgender Schritt a'') durchgeführt wird:
a'') Gewinnung und Präparation von Proben enthaltend T-Zellen und anschließende Kultivierung.
24. Testsystem zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen enthaltend:
a) mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens einen Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17, und
b) Effektorzellen des Immunsystems, vorzugsweise T-Zellen, insbesondere zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen.
25. Verwendung mindestens eines T-Zell-Epitops gemäß einem der Ansprüche 1-4 mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens eines Vektors gemäß Anspruch 10, mindestens einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens eines Komplexes gemäß

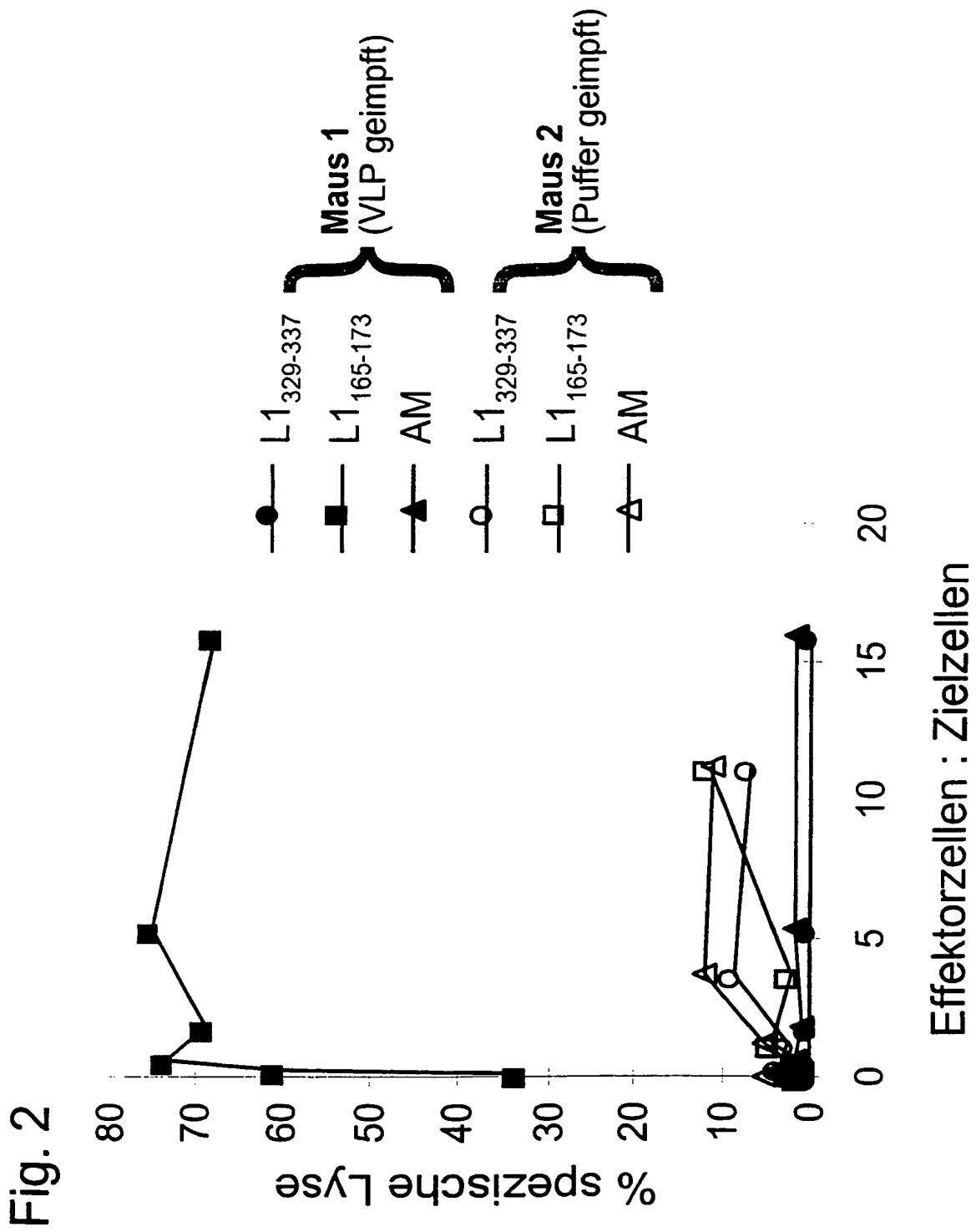
einem der Ansprüche 15-17 zur Auslösung oder zum Nachweis einer Immunantwort.

- 5 26. Arzneimittel oder Diagnostikum enthaltend mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens einen Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
- 10 27. Arzneimittel oder Diagnostikum nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens ein Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens ein Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 in Lösung vorliegt, an eine feste Matrix gebunden ist, und/oder mit einem Adjuvans versetzt ist.
- 15

THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

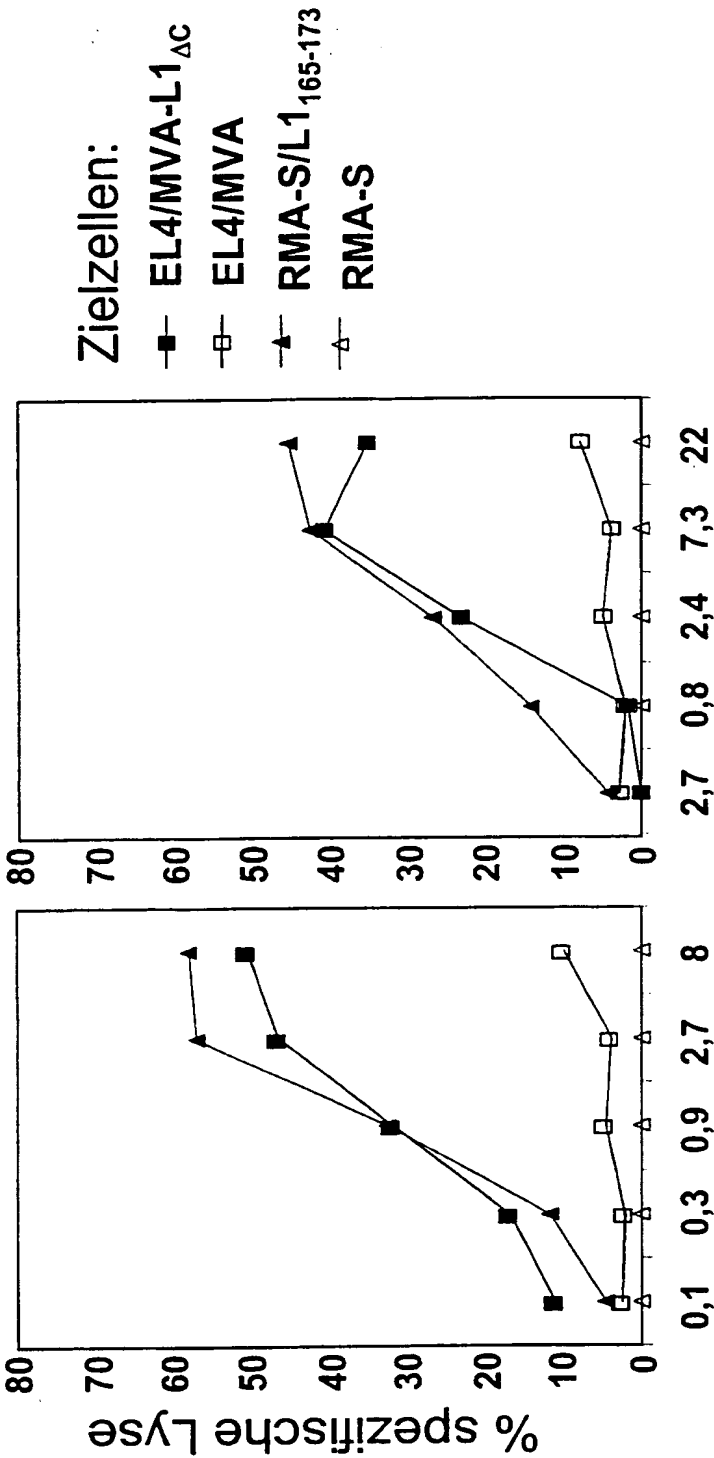
Fig. 3

Effektorzellen

kultiviert mit:

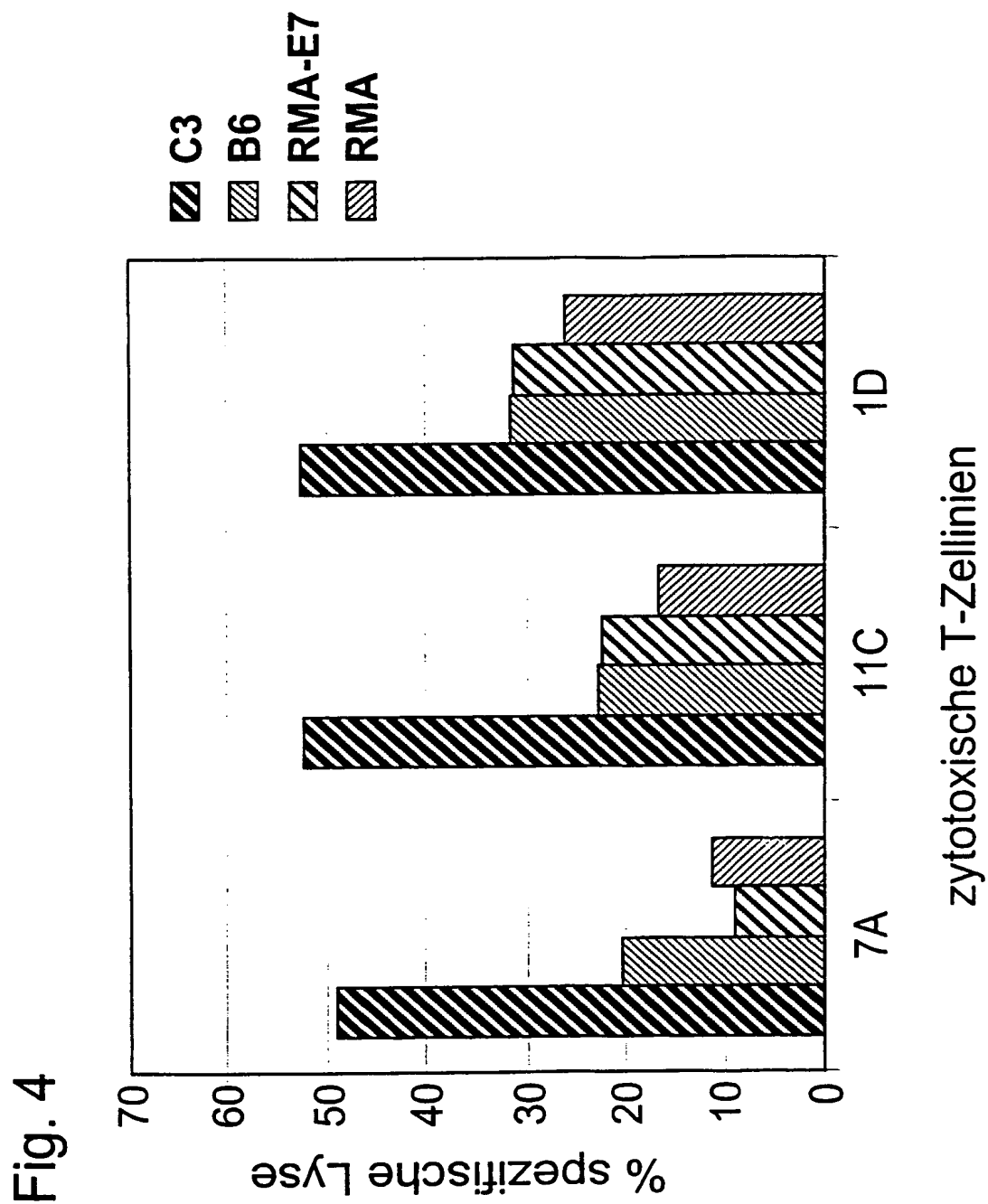
EL4/MVA-L1_{ΔC}

RMA-S/L1₁₆₅₋₁₇₃

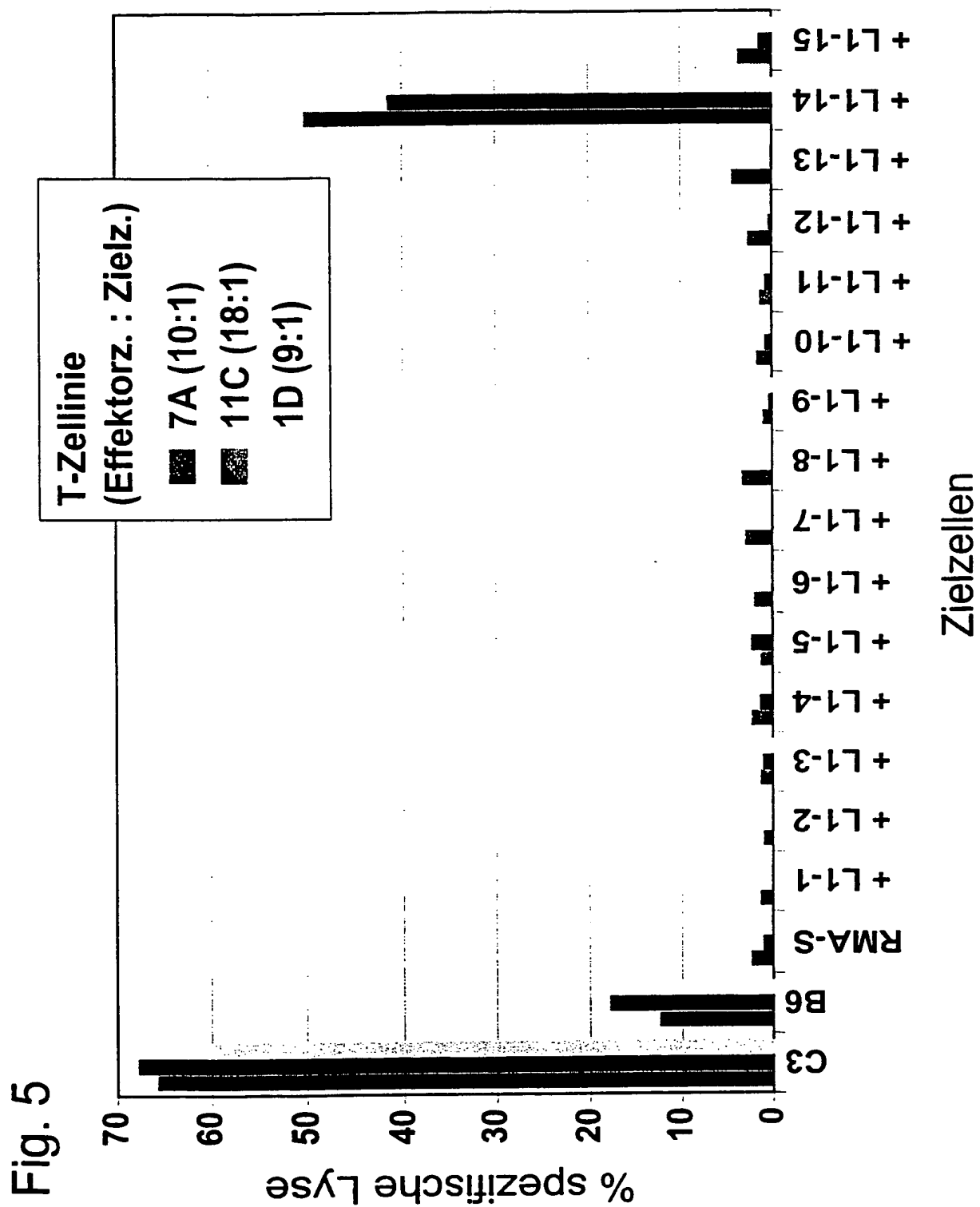


Effektorzellen : Zielzellen

THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> MediGene AG

<110> Deutsches Krebsforschungszentrum

5 <120> Zytotoxische T-Zellepitope des Papillomavirus L1-Proteins und ihre Verwendung in Diagnostik und Therapie

<150> 19925235.1

<151> 1999-06-01

10

<160> 17

<170> MS Word 97/Windows NT

15 <210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 1

20 Ala Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp 9
1

<210> 2

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 2

Ala Gly Val Asp Asn Arg Glu Cys Ile 9
1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 3
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Influenzavirus Typ A
<400> 3
Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met 9
1

10
<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Humanes Papillomavirus Typ 16
15 <400> 4
Gly Ala Met Asp Phe Thr Thr Leu 8
1

<210> 5
20 <211> 8
<212> PRT
<213> Humanes Papillomavirus Typ 16
<400> 5
Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu 8
25 1

<210> 6
<211> 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 6

Met Gln Val Thr Phe Ile Tyr Ile 8

5 1

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 7

Val Tyr His Ile Phe Phe Gln Met 8

1

15 <210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 8

20 Val His Thr Gly Phe Gly Ala Met 8

1

<210> 9

<211> 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 9

Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met 8

5 1

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 10

Val Thr Phe Ile Tyr Ile Leu Val 8

1

15 <210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 11

20 Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Phe Val 8

1

<210> 12

<211> 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 12

Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val 8

5 1

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 13

Lys Lys Tyr Thr Phe Val Thr Val 8

1

15 <210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 14

20 Glu Asn Asp Val Asn Tyr His Ile 8

1

<210> 15

<211> 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 15

Ala Gly Val Asp Asn Arg Glu Cys Ile 9

5 1

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 16

Thr Val Gly Glu Asn Val Pro Asp Asp Leu 10

1

15 <210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Humanes Papillomavirus Typ 16

<400> 17

20 Tyr Lys Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu 10

1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/05005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/37 C07K14/025 C12N5/22 A61K38/16 A61K39/12
G01N33/68 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 279 651 A (BRITISH TECH GROUP) 11 January 1995 (1995-01-11) siehe insbesondere SEQ ID NR: 2 und 3 the whole document ---	1-15, 18-27
X	WO 96 11272 A (MEDIGENE GES FUER MOLEKULARBIO ; PAINSTIL JEANETTE (US); GISSMANN L) 18 April 1996 (1996-04-18) the whole document ---	1-15, 20-22, 24-27
X	WO 93 02184 A (UNIV QUEENSLAND ; CLS LTD (AU)) 4 February 1993 (1993-02-04) cited in the application siehe insbesondere Peptide 17, 33 und 34 (Tabelle 1) the whole document --- -/--	1-8, 11, 15-17, 25

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 September 2000

Date of mailing of the international search report

19/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/05005

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 18220 A (GISSMANN LUTZ ;UNIV LOYOLA CHICAGO (US); MUELLER MARTIN (US)) 15 April 1999 (1999-04-15) the whole document -----	1-4,25
A	S -Y CHAN ET AL: "Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase of the molecular evolution of DNA viruses" JOURNAL OF VIROLOGY,US,NEW YORK, US, vol. 66, no. 10, 1 October 1992 (1992-10-01), pages 5714-5725, XP002094682 ISSN: 0022-538X abstract; figures 2,6 -----	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No

PCT/EP 00/05005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2279651 A	11-01-1995	AU 7040594 A	24-01-1995
		CA 2166333 A	12-01-1995
		EP 0706533 A	17-04-1996
		WO 9501374 A	12-01-1995
		JP 8512045 T	17-12-1996
		NZ 267682 A	28-10-1996
WO 9611272 A	18-04-1996	DE 4435907 A	11-04-1996
		DE 19526752 A	23-01-1997
		AU 4270196 A	02-05-1996
		CA 2202090 A	18-04-1996
		DE 4447664 C	15-04-1999
		EP 0809700 A	03-12-1997
		JP 11504801 T	11-05-1999
		US 6066324 A	23-05-2000
		DE 29521486 U	30-04-1997
WO 9302184 A	04-02-1993	AU 651727 B	28-07-1994
		EP 0595935 A	11-05-1994
		JP 7505042 T	08-06-1995
		SG 48769 A	18-05-1998
WO 9918220 A	15-04-1999	AU 9684698 A	27-04-1999
		EP 1021547 A	26-07-2000
		NO 20001768 A	02-06-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/EP 00/05005

IPK 7	C12N15/37	C07K14/025	C12N5/22	A61K38/16	A61K39/12
	G01N33/68	C12N15/62			

IPK 7 C07K

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, STRAND

Oderwald, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 18220 A (GISSMANN LUTZ ;UNIV LOYOLA CHICAGO (US); MUELLER MARTIN (US)) 15. April 1999 (1999-04-15) das ganze Dokument -----	1-4,25
A	S -Y CHAN ET AL: "Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase of the molecular evolution of DNA viruses" JOURNAL OF VIROLOGY,US,NEW YORK, US, Bd. 66, Nr. 10, 1. Oktober 1992 (1992-10-01), Seiten 5714-5725, XP002094682 ISSN: 0022-538X Zusammenfassung; Abbildungen 2,6 -----	1-4

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Internationaler Patentzeichen
PCT/EP 00/05005

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
GB 2279651 A	11-01-1995	AU 7040594 A	24-01-1995
		CA 2166333 A	12-01-1995
		EP 0706533 A	17-04-1996
		WO 9501374 A	12-01-1995
		JP 8512045 T	17-12-1996
		NZ 267682 A	28-10-1996
WO 9611272 A	18-04-1996	DE 4435907 A	11-04-1996
		DE 19526752 A	23-01-1997
		AU 4270196 A	02-05-1996
		CA 2202090 A	18-04-1996
		DE 4447664 C	15-04-1999
		EP 0809700 A	03-12-1997
		JP 11504801 T	11-05-1999
		US 6066324 A	23-05-2000
		DE 29521486 U	30-04-1997
WO 9302184 A	04-02-1993	AU 651727 B	28-07-1994
		EP 0595935 A	11-05-1994
		JP 7505042 T	08-06-1995
		SG 48769 A	18-05-1998
WO 9918220 A	15-04-1999	AU 9684698 A	27-04-1999
		EP 1021547 A	26-07-2000
		NO 20001768 A	02-06-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 10 SEP 2001

WIPO



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M29186PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05005	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 31/05/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 01/06/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/37		
Anmelder MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 9 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 31/10/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 06.09.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Lanzrein, M Tel. Nr. +49 89 2399 7358 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-31 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-27 eingegangen am 04/04/2001 mit Schreiben vom 02/04/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/5-5/5 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

39-44, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist
- ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
siehe Beiblatt

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☒ alle Teile.
- ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	9, 10, 12
	Nein: Ansprüche	1-8, 11, 13-27
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	9, 10, 12
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-27
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Es wird auf folgendes Dokument verwiesen:

D1: GB-A-2 279 651 (BRITISH TECH GROUP) 11. Januar 1995 (1995-01-11)

D2: WO 93 02184 A (UNIV QUEENSLAND ;CLS LTD (AU)) 4. Februar 1993 (1993-02-04) in der Anmeldung erwähnt

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

Die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde ist der Ansicht, dass die vorliegende Anmeldung die Erfordernisse bezüglich der Einheitlichkeit der Erfindung im Sinne von Art. 34(3) PCT und Regel 13.1 PCT nicht erfüllt.

Die verschiedenen Erfindungen/Gruppen von Erfindungen sind:

- 1) T-Zell Epitop AQIFNKPYW (L₁₃₃₀₋₃₃₈), Varianten, Homologe, Fusionsproteine, entsprechende DNA und Vektoren, Zellen welche das Epitop präsentieren, Komplex, Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen mithilfe des Epitops, Arzneimittel enthaltend das Epitop.
- 2) T-Zell Epitop AGVDNRECI (L₁₆₅₋₁₇₃), Varianten, Homologe, Fusionsproteine, entsprechende DNA und Vektoren, Zellen welche das Epitop präsentieren, Komplex, Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen mithilfe des Epitops, Arzneimittel enthaltend das Epitop.

Infolge der Regel 13.1 PCT darf sich die Internationale Anmeldung "nur auf eine Erfindung oder eine Gruppe von Erfindungen beziehen, die so zusammenhängen, dass sie eine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklichen". Dabei sollte ein technischer Zusammenhang im Sinne der Regel 13.2 PCT bestehen, der in einem oder mehreren gleichen oder entsprechenden besonderen technischen Merkmal/en zum Ausdruck kommt. Die erfinderische Idee bzw. die besonderen technischen Merkmale müssen gegenüber dem Stand der Technik neu und nicht nahegelegt sein.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Aus den folgenden Gründen ist diese Erfordernis bei den obengenannten angeblichen Erfindungen/Gruppen nicht erfüllt:

Das gemeinsame erfinderische Konzept der angeblichen Erfindungen ist die Herstellung und Verwendung von T-Zell Epitopen aus dem HPV 16 L1 Protein. Solche Epitope sowie deren Herstellung und Verwendung sind bereits bekannt aus D1. Die Epitope und Peptide in D1 stammen sogar aus der gleichen Region von L1 wie das Epitop der angeblichen Erfindung 1).

Da es keine weiteren gemeinsame besondere technische Merkmale gibt, müssen die beiden Epitope als separate Erfindungen angesehen werden.

Angesichts der Neuheitseinwände (siehe unten) wurde im Rahmen der vorläufigen internationalen Prüfung auf die Erhebung zusätzlicher Gebühren verzichtet. Im Falle von regionalen Anmeldungen muss aber mit Einheitlichkeitseinwänden gerechnet werden.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Die vorliegende Anmeldung betrifft Papillomavirus T-Zell Epitope aus dem L1 Kapsidstrukturprotein von HPV 16.
Mäuse wurden mit L1-VLP (Virusähnliche Partikel enthaltend eine Deletionsmutante von L1) , L1-CVLP (chimäre Partikel) oder C3-Zellen (mit HPV 16 und ras transformiert) geimpft. Es wird gezeigt, dass Milzzellen aus den L1-VLP oder L1-CVLP geimpften Mäusen die L1₁₆₅₋₁₇₃ präsentierende Zellen lysieren, jedoch nicht die L1₃₃₀₋₃₃₈ präsentierenden Zellen.
Milzzellen aus C3 geimpften Mäusen waren in der Lage, auch L1₃₃₀₋₃₃₈ präsentierende Zellen zu lysieren.
Es wird also gezeigt, dass sowohl L1₁₆₅₋₁₇₃ als auch L1₃₃₀₋₃₃₈ zytotoxische T-cell Epitope darstellen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-8, 11, 13-27 nicht neu ist.
- 2.1 Das Dokument D1 zeigt, dass die Region 311-345 des HPV 16 L1 Proteins als T-Zell Epitop wirkt. 3 spezifische Peptide von je 15 Aminosäuren Länge aus dieser Region stimulieren die Proliferation von T-Zellen aus Patienten mit Cervix Displasien (Tabelle 1, 2). Es wird auch vorgeschlagen, Fusionsproteine mit den genannten Peptiden herzustellen sowie andere chemische Verbindungen daran zu koppeln (Seite 7, Linie 20 - Seite 8 Linie 35). Die Peptide von D1 sind zur Therapie in HPV-assoziierten Krankheiten zu verwenden (z. B. Anspruch 1). Insofern als sich die Produktansprüche 1-8, 26, 27 auf Varianten, Homologe etc. beziehen, sind die Peptide gemäss Seq Id No 2 und 3 aus D1 neuheitsschädlich, denn die Sequenzen überlappen mit dem Peptid L1₃₃₀₋₃₃₈ aus der vorliegenden Anmeldung.

D1 beschreibt auch einen Test zur Ermittlung der spezifischen T-Zell Antwort (Seiten 13-15). Dabei werden die zu testenden Peptide mit autologen APC's und den kultivierten T-Zellen aus den Patienten für 3 Tage inkubiert und darauf wird die T-Zell Proliferation gemessen (für weitere 18 Stunden).

Diese Offenbarungen sind neuheitsschädlich für die Ansprüche 11-17, 20-23, 25 denn der Test in D1 beruht auf der Komplexbildung der Peptide mit MHC in den Antigen präsentierenden Zellen (APC's).

Das Verfahren der Ansprüche 18, 19, 24 ist durch die Testmethode aus D1 auch vorweggenommen.

- 2.2 Das Peptid AGVDNRECI (L1₁₆₅₋₁₇₃) stammt aus einer Region von L1, welche noch nicht als T-Zell Epitop beschrieben wurde. D2 beschreibt ein 15 Aminosäuren langes Peptid (Table 1: Peptid 17) enthaltend die Sequenz von L1₁₆₅₋₁₇₃. Die Wirkung des Peptides als B-Zell Epitop wird beschrieben (Fig. 9). Die in der vorliegenden Anmeldung offenbarte Funktion als T-Zell Epitop wird in D2 jedoch nicht offenbart. Diese Funktion wird auch in keiner Anderen der zitierten Entgegenhaltungen beschrieben. Das spezifische Peptid kann also als neu und erfinderisch angesehen werden.
- Die Ausweitung des Gegenstands der Ansprüche auf Varianten, Homologe etc. führt jedoch dazu, dass der Gegenstand der Produktansprüche betreffend L1₁₆₅₋₁₇₃ nicht neu ist gegenüber dem Peptid 17 aus D2. Obschon die T-Zell Epitop

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Wirkung in D2 nicht beschrieben wurde, ist das Produkt an sich dasselbe. Wie in den PCT Richtlinien (Sektion IV: III-4.8 und IV-7.6) dargelegt, wird ein bekanntes Produkt nicht dadurch neu, dass eine neue Verwendung oder ein neues Merkmal postuliert wird. In diesem Fall sind nur Verwendungsansprüche des betreffenden Produktes gewährbar.

Der Produktschutz könnte also nur für das *spezifische* Peptid AGVDNRECI, d.h. ohne die Erweiterung auf Varianten, Homologe etc., gewährt werden.

Verwendungsansprüche hingegen könnten in breiterer Form gewährt werden.

3. Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33 (3) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 9, 10, 12 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruht.

- 3.1 Die Ansprüche 9, 10 und 12 betreffen Nukleinsäuren, Vektoren sowie transfizierte Zellen. Solange die Peptide der Ansprüche 5-8 nicht neu und erfinderisch sind, kann für die entsprechenden DNA Ansprüche die erfinderische Tätigkeit im Sinne von Art. 33 (3) PCT nicht anerkannt werden, denn die rekombinante Expression von Peptiden ist eine allseits geläufige Standardmethode in der Molekularbiologie.

- 3.2 Die Neuheitseinwände unter 2. kommen dadurch zustande, dass die Ansprüche sich auf Varianten, Homologe etc. erstrecken.

Betrachtet man nur den Gegenstand in Anspruch 1, der gegenüber dem Stand der Technik neu ist, nämlich die spezifischen Peptide, so ist feststellbar, dass die erfinderische Tätigkeit im Sinne von Art. 33 (3) mangelt.

Ausgehend von D1, welches als der nächstliegende Stand der Technik angesehen wird, war das Peptid L1₃₃₀₋₃₃₈ nahegelegt. In D1 wird nämlich schon die Epitopenregion abgegrenzt. Diese liegt demnach zwischen den Aminosäuren 311 und 345 und D1 schlägt bereits drei Peptide aus der Region vor. Der Beitrag der vorliegenden Anmeldung liegt also darin ein weiteres Peptid aus derselben Region herzustellen. Solange jedoch nicht ein spezieller technischer Effekt vorliegt, welcher das Peptid der Anmeldung gegenüber denjenigen aus D1 auszeichnet, handelt es sich nur um eine zufällige Auswahl aus mehreren Möglichkeiten, welche nicht als erfinderisch angesehen werden kann.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Das Peptid L1₁₆₅₋₁₇₃ ist im Unterschied zu L1₃₃₀₋₃₃₈ nicht als T-zell Epitop nahegelegt (siehe unter 2.2) und deshalb können die Teile der Ansprüche, welche sich auf dieses spezifische Peptid beziehen, als erfinderisch im Sinne von Art 33 (3) PCT angesehen werden.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Der Begriff "kein natürlich vorkommendes L1 Protein" in Anspruch 5 ist unklar. Um zu entscheiden, ob ein gegebenes Protein natürlich vorkommt, müsste man alle natürlichen Sequenzen kennen. Dies ist jedoch nicht möglich angesichts der bekannterweise hohen Mutationsraten bei Viren.
2. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände des vorliegenden Anspruchs 25 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

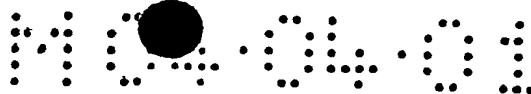
PCT/EP00/05005
MediGene Aktiengesellschaft
Deutsches Krebsforschungszentrum

2. April 2001
M29186PCT BÖ/DLh/pvc

Patentansprüche

1. T-Zell-Epitop mit einer Aminosäuresequenz AQIFNKPYW,
5 AGVDNRECI, und/oder eine funktionell aktive Variante davon.
2. T-Zell-Epitop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte
Variante eine Sequenzhomologie zu AQIFNKPYW oder AGVDNRECI
von mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 75% und insbesondere
10 mindestens 85% auf Aminosäureebene besitzt.
3. T-Zell-Epitop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte
Variante eine strukturelle Homologie zu AQIFNKPYW oder
AGVDNRECI hat.
15
4. T-Zell-Epitop nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet,
daß das T-Zell-Epitop ein zytotoxisches T-Zell-Epitop ist.
5. Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop nach einem der Ansprüche 1 bis
20 4, wobei die Verbindung kein natürlich vorkommendes L1-Protein, d.h.
ein natürlich vorkommendes L1-Protein, an dem selbst oder in dessen
Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenz genetische Veränderungen vor-
genommen wurden, eines Papillomavirus und keine ausschließlich N-
terminale oder ausschließlich C-terminale Deletionsmutante eines natür-
25 lich vorkommenden L1-Proteins eines Papillomavirus ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



6. Verbindung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Polypeptid, insbesondere ein Fusionsprotein ist.
- 5 7. Verbindung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ein Polypeptid von mindestens 50 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens 35 Aminosäuren, insbesondere von mindestens 20 Aminosäuren und in besonders bevorzugter Weise von mindestens 10 Aminosäuren Länge ist.
- 10 8. Verbindung nach einem der Ansprüche 5-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung eine chemische, radioaktive, nicht radioaktive Isotopen und/oder Fluoreszenzmarkierung des T-Zell-Epitops und/oder des genannten Fusionsproteins, und/oder eine chemische Modifikation des T-Zell-Epitops und/oder Fusionsproteins enthält.
- 15 9. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein T-Zell-Epitop oder eine Verbindung enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8 kodiert.
- 20 10. Vektor, insbesondere ein Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 enthält.
11. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8 enthält, vorzugsweise präsentiert.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

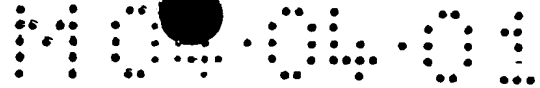


12. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 und/oder einem Vektor gemäß Anspruch 10 transfiziert, transformiert, und/oder infiziert ist.
- 5 13. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle mit mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und/oder mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8, inkubiert wurde.
- 10 14. Zelle nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine B-Zelle, ein Makrophage, eine Dendritische Zelle, eine embryonale Zelle, ein Fibroblast, eine B16F10-, eine B6-, eine C3-, eine EL4-, eine RMA- oder eine RMA-S-Zelle ist.
- 15 15. Komplex enthaltend ein T-Zell-Epitope gemäß einem der Ansprüche 1-4 oder eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und mindestens eine weitere Verbindung.
- 20 16. Komplex nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex mindestens ein MHC-Klasse I-Molekül, vorzugsweise als H2-D^b-Tetramer enthält.
- 25 17. Komplex nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das genannte MHC-Klasse I Molekül ein humanes oder murines MHC-Klasse I Molekül, insbesondere ein von C57B1/6 Mäusen abgeleitetes MHC-Klasse I Molekül ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

18. Verfahren zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen durch mindestens eine Verbindung, enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, das folgende Schritte enthält:
- a) Stimulation von Zellen mit mindestens einer genannten Verbindung;
 - 5 b) Zugabe von mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 präsentiert oder eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 15-17, und
 - c) Bestimmung der Aktivierung von T-Zellen.
- 10 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es nach Schritt a) folgenden zusätzlichen Schritt a') enthält:
- a') Cokultivierung der Zellen für ca. 12 Tage, insbesondere mindestens 5 Tage mit:
- 15 (i) mindestens einer Zielzelle beladen mit einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17, mindestens einem Capsomer, mindestens einem stabilen Capsomer, mindestens einem VLP, mindestens einem CVLP, und/oder mindestens einem Virus,
 - (ii) mindestens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17,
 - 20 (iii) und/oder mindestens einer Zielzelle, die ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4 präsentiert,
- bevor sich Schritt b) anschließt.
20. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach einem der Ansprüche 11, 13, 14, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzelle mit mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8 und/oder mindestens
- 25

THIS PAGE BLANK (USPTO)



tens einem Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 enthaltend ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 5-8, inkubiert wird.

21. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach einem der Ansprüche 11,
5 12, 14, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Zielzellen mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 9 und/oder einem Vektor gemäß Anspruch 10 transfiziert, transformiert und/oder infiziert wird.
22. Verfahren zur Herstellung einer Zielzelle nach Anspruch 20 oder 21, da-
10 durch gekennzeichnet, daß die Zielzelle eine B-Zelle, ein Makrophage, eine Dendritische Zelle, eine embryonale Zelle, ein Fibroblast, eine B16F10-, eine B6-, eine C3-, eine EL4-, eine RMA- oder eine RMA-S-Zelle ist.
23. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß an-
15 stelle von Schritt a) folgender Schritt a'') durchgeführt wird:
a'') Gewinnung und Präparation von Proben enthaltend T-Zellen und anschließende Kultivierung.
24. Testsystem zum in vitro Nachweis der Aktivierung von T-Zellen enthal-
20 tend:
a) mindestens ein T-Zell-Epitop gemäß einem der Ansprüche 1-4, mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens ei-
25 nen Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17, und
b) Effektorzellen des Immunsystems, vorzugsweise T-Zellen, insbesondere zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



25. Verwendung mindestens eines T-Zell-Epitops gemäß einem der Ansprüche 1-4 mindestens einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens eines Vektors gemäß Anspruch 10, mindestens einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens eines Komplexes gemäß einem der Ansprüche 15-17 zur Auslösung oder zum Nachweis einer Immunantwort.
26. Arzneimittel oder Diagnostikum enthaltend mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens einen Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
27. Arzneimittel oder Diagnostikum nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 5-8, mindestens ein Vektor gemäß Anspruch 10, mindestens eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 11-14, und/oder mindestens ein Komplex gemäß einem der Ansprüche 15-17 in Lösung vorliegt, an eine feste Matrix gebunden ist, und/oder mit einem Adjuvans versetzt ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP/05005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/37 C07K14/025 C12N5/22 A61K38/16 A61K39/12
G01N33/68 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 279 651 A (BRITISH TECH GROUP) 11 January 1995 (1995-01-11) siehe insbesondere SEQ ID NR: 2 und 3 the whole document ---	1-15, 18-27
X	WO 96 11272 A (MEDIGENE GES FUER MOLEKULARBIO ; PAINSTIL JEANETTE (US); GISSMANN L) 18 April 1996 (1996-04-18) the whole document ---	1-15, 20-22, 24-27
X	WO 93 02184 A (UNIV QUEENSLAND ; CLS LTD (AU)) 4 February 1993 (1993-02-04) cited in the application siehe insbesondere Peptide 17, 33 und 34 (Tabelle 1) the whole document ---	1-8, 11, 15-17, 25
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 September 2000

Date of mailing of the international search report

19/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/05005

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 18220 A (GISSMANN LUTZ ;UNIV LOYOLA CHICAGO (US); MUELLER MARTIN (US)) 15 April 1999 (1999-04-15) the whole document	1-4, 25
A	S -Y CHAN ET AL: "Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase of the molecular evolution of DNA viruses" JOURNAL OF VIROLOGY, US, NEW YORK, US, vol. 66, no. 10, 1 October 1992 (1992-10-01), pages 5714-5725, XP002094682 ISSN: 0022-538X abstract; figures 2,6	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No

PCT/EU/05005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2279651 A	11-01-1995	AU 7040594 A	24-01-1995
		CA 2166333 A	12-01-1995
		EP 0706533 A	17-04-1996
		WO 9501374 A	12-01-1995
		JP 8512045 T	17-12-1996
		NZ 267682 A	28-10-1996
WO 9611272 A	18-04-1996	DE 4435907 A	11-04-1996
		DE 19526752 A	23-01-1997
		AU 4270196 A	02-05-1996
		CA 2202090 A	18-04-1996
		DE 4447664 C	15-04-1999
		EP 0809700 A	03-12-1997
		JP 11504801 T	11-05-1999
		US 6066324 A	23-05-2000
		DE 29521486 U	30-04-1997
WO 9302184 A	04-02-1993	AU 651727 B	28-07-1994
		EP 0595935 A	11-05-1994
		JP 7505042 T	08-06-1995
		SG 48769 A	18-05-1998
WO 9918220 A	15-04-1999	AU 9684698 A	27-04-1999
		EP 1021547 A	26-07-2000
		NO 20001768 A	02-06-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWES.

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M29186PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 05005	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 31/05/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 01/06/1999
Anmelder MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 4



wie vom Anmelder vorgeschlagen



keine der Abb.



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PC 00/05005

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7	C12N15/37	C07K14/025	C12N5/22	A61K38/16	A61K39/12
	G01N33/68	C12N15/62			

IPK 7 C07K

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, STRAND

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GB 2 279 651 A (BRITISH TECH GROUP) 11. Januar 1995 (1995-01-11) siehe insbesondere SEQ ID NR: 2 und 3 das ganze Dokument ---	1-15, 18-27
X	WO 96 11272 A (MEDIGENE GES FUER MOLEKULARBIO ;PAINSTIL JEANETTE (US); GISSMANN L) 18. April 1996 (1996-04-18) das ganze Dokument ---	1-15, 20-22, 24-27
X	WO 93 02184 A (UNIV QUEENSLAND ;CLS LTD (AU)) 4. Februar 1993 (1993-02-04) in der Anmeldung erwähnt siehe insbesondere Peptide 17, 33 und 34 (Tabelle 1) das ganze Dokument ---	1-8, 11, 15-17, 25

	-/--	

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Oderwald, H

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 18220 A (GISSMANN LUTZ ;UNIV LOYOLA CHICAGO (US); MUELLER MARTIN (US)) 15. April 1999 (1999-04-15) das ganze Dokument ---	1-4,25
A	S -Y CHAN ET AL: "Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase of the molecular evolution of DNA viruses" JOURNAL OF VIROLOGY,US,NEW YORK, US, Bd. 66, Nr. 10, 1. Oktober 1992 (1992-10-01), Seiten 5714-5725, XP002094682 ISSN: 0022-538X Zusammenfassung; Abbildungen 2,6 -----	1-4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC 00/05005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2279651 A	11-01-1995	AU 7040594 A	24-01-1995
		CA 2166333 A	12-01-1995
		EP 0706533 A	17-04-1996
		WO 9501374 A	12-01-1995
		JP 8512045 T	17-12-1996
		NZ 267682 A	28-10-1996
WO 9611272 A	18-04-1996	DE 4435907 A	11-04-1996
		DE 19526752 A	23-01-1997
		AU 4270196 A	02-05-1996
		CA 2202090 A	18-04-1996
		DE 4447664 C	15-04-1999
		EP 0809700 A	03-12-1997
		JP 11504801 T	11-05-1999
		US 6066324 A	23-05-2000
		DE 29521486 U	30-04-1997
WO 9302184 A	04-02-1993	AU 651727 B	28-07-1994
		EP 0595935 A	11-05-1994
		JP 7505042 T	08-06-1995
		SG 48769 A	18-05-1998
WO 9918220 A	15-04-1999	AU 9684698 A	27-04-1999
		EP 1021547 A	26-07-2000
		NO 20001768 A	02-06-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REPLACED BY
ART 34 AMDT

- 31 -

Patent claims

1. T-cell epitope having an amino acid sequence AQIFNKPYW, AGVDNRECI, and/or a functionally active variant thereof.
2. T-cell epitope according to claim 1, characterized in that said variant has a sequence homology to AQIFNKPYW or AGVDNRECI of at least 65%, preferably at least 75% and in particular at least 85% at the amino acid level.
3. T-cell epitope according to claim 1, characterized in that said variant is structurally homologous to AQIFNKPYW or AGVDNRECI.
4. T-cell epitope according to any of claims 1-3, characterized in that the T-cell epitope is a cytotoxic T-cell epitope.
5. Compound comprising a T-cell epitope according to any of claims 1 to 4, wherein the compound is not a naturally occurring L1 protein, i.e. is a naturally occurring L1 protein which itself or whose nucleotide and/or amino acid sequence has been genetically modified, of a papillomavirus and not an exclusively N-terminal or an exclusively C-terminal deletion mutant of a naturally occurring L1 protein of a papillomavirus.
6. Compound according to claim 5, characterized in that the compound is a polypeptide, in particular a fusion protein.
7. Compound according to claim 5 or 6, characterized in that the compound is a polypeptide of at least 50 amino acids, preferably of at least 35 amino acids, in particular of at least 20 amino acids

THIS PAGE BLANK (USPTO)

and particularly preferably of at least 10 amino acids, in length.

8. Compound according to any of claims 5-7, characterized in that the compound contains a chemical, radioactive, nonradioactive isotope and/or fluorescent label of the T-cell epitope and/or of said fusion protein, and/or a chemical modification of the T-cell epitope and/or fusion protein.
9. Nucleic acid, characterized in that it codes for a T-cell epitope or a compound containing a T-cell epitope according to any of claims 5-8.
10. Vector, in particular an expression vector, characterized in that it contains a nucleic acid according to claim 9.
11. Cell, characterized in that it contains, preferably presents, at least one T-cell epitope according to any of claims 5-8.
12. Cell according to claim 11, characterized in that the cell is transfected, transformed and/or infected with a nucleic acid according to claim 9 and/or a vector according to claim 10.
13. Cell according to claim 11, characterized in that the cell was incubated with at least one compound according to any of claims 5-8 and/or at least one complex according to any of claims 15-17 containing a T-cell epitope according to any of claims 5-8.
14. Cell according to claim 11 or 12, characterized in that the cell is a B cell, a macrophage, a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dendritic cell, an embryonic cell, a fibroblast, a B16F10, a B6, a C3, an EL4, a RMA or a RMA-S cell.

15. Complex comprising a T-cell epitope according to any of claims 1-4 or a compound according to any of claims 5-8 and at least one further compound.
16. Complex according to claim 15, characterized in that the complex contains at least one MHC class I molecule, preferably as H2-D^b tetramer.
17. Complex according to claim 16, characterized in that the said MHC class I molecule is a human or murine MHC class I molecule, in particular an MHC class I molecule derived from C57B1/6 mice.
18. Method for in vitro detection of the activation of T cells by at least one compound containing a T-cell epitope according to any of claims 1-4, which comprises the following steps:
 - a) stimulation of cells using at least one said compound;
 - b) addition of at least one target cell presenting a T-cell epitope according to any of claims 1-4 or a complex according to any of claims 15-17, and
 - c) determination of T-cell activation.
19. Method according to claim 18, characterized in that it comprises, after step a), the following additional step a')):
 - a') coculturing of the cells for approx. 12 days, in particular at least 5 days, with:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(i) at least one target cell loaded with a compound according to any of claims 5-8, at least one complex according to any of claims 15-17, at least one capsomer, at least one stable capsomer, at least one VLP, at least one CVLP, and/or at least one virus,

(ii) at least one complex according to any of claims 15-17,

(iii) and/or at least one target cell presenting a T-cell epitope according to any of claims 1-4,

prior to step b).

20. Method for producing a target cell according to any of claims 11, 13, 14, 18 or 19, characterized in that the target cell is incubated with at least one compound according to any of claims 5-8 and/or at least one complex according to any of claims 15-17 containing a T-cell epitope according to any of claims 5-8.

21. Method for producing a target cell according to any of claims 11, 12, 14, 18 or 19, characterized in that the target cells is transfected, transformed and/or infected with a nucleic acid according to claim 9 and/or a vector according to claim 10.

22. Method for producing a target cell according to claim 20 or 21, characterized in that the target cell is a B cell, a macrophage, a dendritic cell, an embryonic cell, a fibroblast, a B16F10, a B6, a C3, an EL4, a RMA or a RMA-S cell.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

23. Method according to claim 18 or 19, characterized in that instead of step a) the following step a") is carried out:

a") production and preparation of samples containing T cells and subsequent culturing.

24. Assay system for in vitro detection of the activation of T cells, comprising:

a) at least one T-cell epitope according to any of claims 1-4 at least one compound according to any of claims 5-8, at least one vector according to claim 10, at least one cell according to any of claims 11-14, and/or at least one complex according to any of claims 15-17, and

b) effector cells of the immune system, preferably T cells, in particular cytotoxic T cells or T helper cells.

25. Use of at least one T-cell epitope according to any of claims 1-4 at least one compound according to any of claims 5-8, at least one vector according to claim 10, at least one cell according to any of claims 11-14, and/or at least one complex according to any of claims 15-17 for causing or detecting an immune response.

26. Medicament or diagnostic agent, comprising at least one compound according to any of claims 5-8, at least one vector according to claim 10, at least one cell according to any of claims 11-14, and/or at least one complex according to any of claims 15-17 and, if necessary, a pharmaceutically acceptable carrier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

27. Medicament or diagnostic agent according to claim 26, characterized in that at least one compound according to any of claims 5-8, at least one vector according to claim 10, at least one cell according to any of claims 11-14, and/or at least one complex according to any of claims 15-17 is present in solution, bound to a solid matrix and/or mixed with an adjuvant.

THIS PAGE BLANK (USPTO)